

Unterschiedlicher Thymidinstoffwechsel bei benignen und malignen  
Mesothelzellen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Gisela Zopf  
aus Weinheim/Bergstraße

Gießen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Radiologie  
Wilhelm-Conrad-Röntgen-Klinik  
Abteilung Strahlentherapie  
Leiter: Prof. Dr. v. Lieven  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. v. Lieven

Gutachter: Prof. Dr. Schäffer

Tag der Disputation: 20. November 2001

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
Ziel der eigenen Untersuchungen .....	1
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>3</b>
2.1 Herkunft der Zelllinien .....	3
2.2 Kulturbedingungen .....	3
2.3 Behandlung mit Medikamenten .....	4
2.4 Die Koloniebildungsmethode.....	5
2.5 Autoradiografien .....	5
2.6 Die Tritium-Thymidin-Inkorporationsmethode .....	6
2.7 Statistik .....	8
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>9</b>
3.1 Toxizität von Interferon und Taxol auf oxische und anoxische ZK 70 Mesotheliomzellen.....	9
3.2 Autoradiografien unbehandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 643 mit Tritiumthymidin .....	14
3.3 Autoradiografien der Ovarialcarcinomzelllinie sp3 mit Tritiumthymidin .....	14
3.4 Autoradiografien benigner Mesothelien mit Tritiumthymidin.....	15
3.5 Autoradiografien benigner Mesothelien mit Tritiumthymidinmonophosphat .....	16
3.6 Autoradiografien der Mesotheliomlinie ZK 684 mit Tritiumthymidin .....	17
3.6.1 unbehandelte Zellen .....	17
3.6.3 nach Interferon.....	19
3.6.3 nach Taxol.....	21

3.6.4 nach Interferon und Taxol .....	23
3.7 Autoradiografie der Mesotheliomlinie ZK 684 mit Tritiumthymidinmonophosphat	25
3.7.1 Unbehandelte Zellen .....	25
3.7.2 nach Interferon.....	27
3.7.3 nach Taxol.....	29
3.7.4 nach Interferon und Taxol.....	31
3.8 Zeitverlauf des Tritiumthymidineinbaus in die Mesotheliomzellen.....	35
3.9 Zeitverlauf des Tritiumthymidinmonophosphateinbaus in Mesotheliomzellen (ZK 684).....	36
3.10 Einfluß von Interferon und Taxol auf die Tritiumthymidininkorporation bei sp3- Ovarialcarcinomzellen.....	38
3.11 Einfluß von Interferon und Taxol auf die Tritiumthymidinmonophosphatinkorporation bei Ovarialcarcinomzellen(sp3).....	40
3.12 Zusammenschau der Ergebnisse.....	41
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>42</b>
4.1 Vergleich der Koloniebildungsmethode mit der Tritiumthymidininkorporationsmethode.....	42
4.2 Autoradiografien .....	42

4.2.1 Inkorporation von Thymidin und Thymidinmonophosphat in nicht behandelte Zellen.....	43
4.2.1.1 Unterschiedliches intrazelluläres Verteilungsverhalten der beiden Tracer.....	43
4.2.1.2 Transport und Verstoffwechselung von Thymidin und Thymidinmonophosphat .....	44
4.2.2 Inkorporation von Thymidin und Thymidinmonophosphat in behandelte Zellen .....	50
4.2.2.1 Behandlung mit Interferon.....	50
4.2.2.2 Behandlung mit Taxol sowie Kombinationen aus Interferon und Taxol.....	51
4.3.1 Beurteilung des Zeitverlaufs der Tritium-Thymidin und Tritiumthymidinmonophosphatinkorporation.....	52
4.3.2 Aussagefähigkeit beider Methoden .....	53
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>6. Literatur.....</b>	<b>59</b>
<b>7. Anhang (Tabellen) .....</b>	<b>80</b>

## **1. EINLEITUNG**

### **Ziel der eigenen Untersuchungen**

Das Mesotheliom leitet sich von den Deckzellen der serösen Häute – Pleura, Peritoneum und Perikard her. Diese stammen entwicklungsgeschichtlich aus dem Mesoderm. Es besteht ein ätiologischer Zusammenhang mit einer Asbestexposition. Die Prognose ist trotz vielfältiger Anstrengungen auch unter Einschluß neuerer Zytostatika und immuntherapeutischer Ansätze noch immer ungünstig.

Bei der Untersuchung der Wirkung zweier neuer Substanzen, nämlich von Taxol und Interferon-Beta, auf das Proliferationsverhalten von Mesotheliomzellen fanden sich in Vorversuchen Hinweise auf einen atypischen Thymidinstoffwechsel maligner Mesothelzellen.

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten benigner und maligner Mesothelzellen sowie vergleichsweise auch von Ovarialcarcinomzellen bei der Koloniebildungsmethode, der Autoradiographie und der Tritiumthymidininkorporation mit und ohne Taxol und Interferon systematisch zu untersuchen und besonders im Hinblick auf den Thymidinstoffwechsel zu interpretieren.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Herkunft der Zelllinien**

Als in-vitro-Modell des Mesothelioms dienten die vier etablierten Mesotheliomlinien ZK 70, 125, 643 und 684. Diese wurden im Pathologischen Institut der Universität Gießen etabliert. Es handelte sich hierbei um epitheliale Mesotheliome. Benigne Mesothelien wurden aus Ascites bzw. Pleurapunktaten von insgesamt 5 Patienten angezüchtet.

### **2.2 Kulturbedingungen**

#### **Standardkulturbedingungen**

Die Anzucht der Zellen erfolgte in RPMI-Medium (Fa. Biochrom) mit 15% foetalem Kälberserum (Fa. Biochrom) in Zellkulturflaschen der Fa. Falcon. Als Inkubator diente ein Begasungsbrutschrank der Firma Heraeus. Das Inkubationsvolumen betrug 25ml Kulturmedium, welches alle zwei Tage gewechselt wurde. Die Inkubationstemperatur lag konstant bei 37°C. Der Inkubator hielt den CO<sub>2</sub>-Gehalt der Atmosphäre im Innenraum bei 5% konstant. Die Zugabe von Aqua ad iniectabilia in den Innenbehälter des Brutschrankes bewirkte durch Verdunstung eine Luftfeuchtigkeit von nahezu 100%.

## **Kultur unter hypoxischen Bedingungen**

Zum Erreichen hypoxischer Kulturbedingungen wurde zunächst 24 Stunden lang eine Stickstoffüberdruckbegasung durchgeführt. Die dann gemessenen Sauerstoffkonzentrationen lagen unter 1%. Die jeweiligen Medikamente wurden nach Erreichen hypoxischer Bedingungen zugegeben(Dreiwegehahn).

### **2.3. Behandlung mit Medikamenten**

#### **Interferon –Beta**

Die Firma Dr. Rentschler stellte Interferon-Beta(Fiblaferon) zur Verfügung. Es handelt sich hierbei um gentechnologisch hergestelltes natürliches Interferon-Beta. Die Stammlösung wurde von einer Ausgangskonzentration von 1 Mio I.E./ml mit Kulturmedium auf eine Konzentration von 50 bzw. 100 I.E./ml verdünnt.

#### **Taxol**

Die Firma Bristol lieferte Taxol(Paclitaxel); dieses lag in der Ausgangskonzentration 6mg/ml vor und wurde mit Kulturmedium(RPMI 1640 mit 15% foetalem Kälberserum) auf eine Endkonzentration von 3, 6, bzw. 12ng/ml verdünnt.



## **2.4 Die Koloniebildungsmethode**

Die Koloniebildungsmethode basiert auf der Fähigkeit einzelner isolierter Zellen zur Teilung und damit zur Bildung eines Klons. Eine Kolonie umfaßt mindestens 50 Zellen. Nach Aussaat von jeweils 1000 Zellen auf 5ml Kulturmedium(RPMI-Medium mit 15% foetalem Kälberserum) in Kulturflaschen der Fa. Falcon(50 ml Inhalt, Wachstumsfläche 25cm<sup>2</sup>) wurde den Kontrollgruppen kein Zusatz beigegeben, den Versuchsgruppen jeweils Fiblaferon bis zu einer Endkonzentration von 25 bzw. 50 I.E./ml bzw. Taxol bis zu einer Endkonzentration im Kulturmedium von 6ng/ml. Die Zellen wurden anschließend 5 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 5 Tagen wurde das Medium abgekippt und die gebildeten Kolonien mit Kristallviolett(Fa. Serva) gefärbt und ausgezählt.

## **2.5 Autoradiografien**

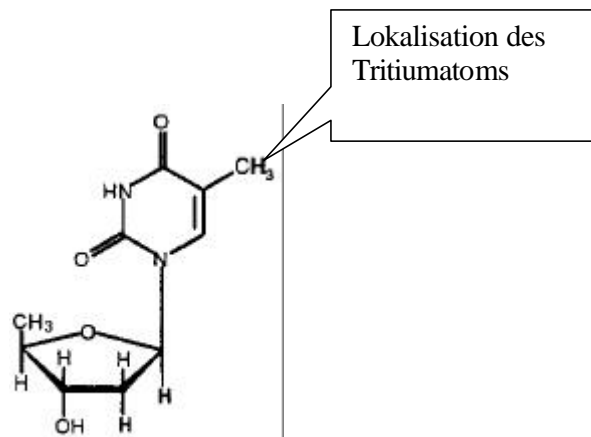
Zunächst wurden 1 Mio Zellen auf Petrischalen(Fa Greiner) ausgesät. Das Inkubationsvolumen betrug 5ml. Die Kontrollgruppen wurden ohne Zusätze im Kulturmedium ausgesät. Parallel zu den Kontrollgruppen wurden Versuchsgruppen mit 100 I.E: Fiblaferon, 12 ng Taxol/ml Kulturmedium sowie Kombinationen aus beiden Substanzen angesetzt. Dem Kulturmedium wurde 1 MicroCi/ml Tritiumthymidin (22Ci/mmol, Amersham) bzw. 1 MicroCi (22Ci/mmol) Tritium-Thymidintriphosphat (Amersham)zugesezt. Die Zugabe der Tracer erfolgte jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen , d. h. nach einer Exposition mit Interferon bzw.

Taxol von 24, 48 oder 72h und bei den entsprechenden Kontrollgruppen. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden wurde das Medium abgekippt, und die Petrischalen wurden vorsichtig zweimal mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend an der Luft getrocknet. Die Belichtung der angewandten Fotoemulsion der Firma Kodak dauerte anschließend zwei Wochen.

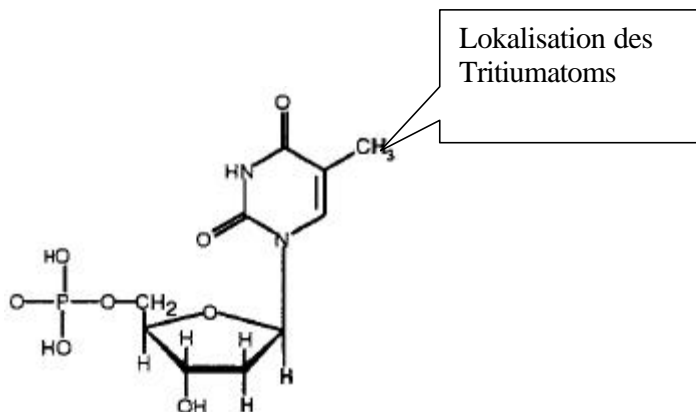
## **2.6 Die Tritium-Thymidin-Inkorporationsmethode**

Zur Untersuchung der DNA-Synthesehemmung kam die von Collins und Johnson an Fibroblasten erprobte Tritium-Thymidin-Inkorporationsmethode(11; 19; 20; 21; 74) zur Anwendung. Die Zellen wurden auf 24-Lochplatten der Firma Falcon ausgesät. Das Inkubationsvolumen betrug jeweils 1ml. Neben den Kontrollgruppen ohne weitere Zusätze im Kulturmedium kamen Gruppen mit 100 I.E. Interferon-Beta bzw 12ng Taxol/ml sowie Kombinationen aus beiden Substanzen zur Untersuchung. Die Zugabe der beiden Tracer erfolgte nach einer Expositionszeit von 24, 48 bzw. 72 Stunden gegenüber dem Kontrollmedium bzw. Interferon und Taxol.. Die Kulturen wurden eine Stunde lang mit Tritium-Thymidin oder Tritium-Thymidinmonophosphat bei 37° und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Tritiumthymidinmonophosphat entsteht aus Tritiumthymidintriphosphat nach Abspaltung eines Pyrophosphatrests. Tritiumthymidintriphosphat wurde von der Fa. Amersham in Alkohol gelöst geliefert. Das Gesamtvolumen betrug zunächst 0,250 ml. Wir füllten mit Aqua ad iniectabilia auf ein Gesamtvolumen von 1ml auf. In der so entstandenen wässrigen Lösung ist Tritiumthymidintriphosphat nicht stabil; es

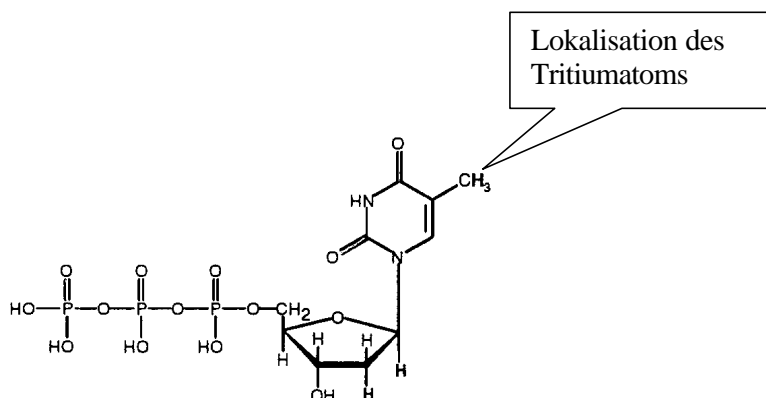
erfolgt eine Hydrolyse mit Abspaltung eines Pyrophosphatrestes, der wiederum hydrolytisch in zwei Phosphationen gespalten wird. Die Methylgruppe des Thymidins trägt das Tritiumatom. Folglich werden in den Autoradiografien bzw. in den Inkorporationsversuchen auch bei Spaltung des Thymidins bzw. Thymidinmonophosphats die Verteilungen des Thyminrests dargestellt bzw. gemessen(s Abb.1-3).



**Abb. 1 Tritium - Thymidin**



**Abb. 2 Tritium – Thymidin – Monophosphat**



**Abb. 3 Tritium – Thymidin – Triphosphat**

Nach Abnahme des Markierungsmediums wurden die Zellen zweimal mit 0,5ml 5%iger Trichloressigsäure behandelt und das entstandene Präzipitat mit SDS(DodecylsulfateNa Salt) solubilisiert. Je 0,1 ml wurden zur Proteinbestimmung nach Markwell(50) abgenommen. Die verbleibenden 0,4 ml wurden mit je 4ml

Szintillationslösung (Rotiszint 2200 der Fa. Roth, Karlsruhe) durchmischt und in Mikrovials im Beta-Counter gemessen. Die gemessene Aktivität wurde auf das Gesamtprotein bezogen

## 2.7 Statistik

Für jede Stichprobe wurde der Mittelwert  $M$  und die Standardabweichung  $\sigma$  berechnet. Die Streuung der Standardabweichung  $\sigma(\sigma_{\text{est}})$  wurde nach der Formel

$$\sigma(\sigma_{\text{est}}) = \frac{\sigma}{\sqrt{2n}} \quad \text{errechnet.}$$

Zur Signifikanzprüfung wurde zunächst die Differenz der Mittelwerte  $M_1 - M_2$  berechnet. Die Differenz der Mittelwerte wurde nach der Formel in  $t$ -Werte überführt:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sigma_M} \quad ; \quad \text{wobei } \sigma_M = \frac{\sigma_{\text{est}}}{\sqrt{n}}$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade beträgt  $n-1$  ( $n$  = Umfang der Stichprobe). Die Signifikanzschranke wurde mit  $p = 5\%$  festgesetzt. Anhand der Freiheitsgrade wurde das zugehörige Intervall der  $t$ -Werte bestimmt (Tabelle). Die Differenzen zwischen den Stichproben wurde für signifikant angesehen, wenn der errechnete  $t$ -Wert außerhalb des 95% -Intervalls lag.

### 3. Ergebnisse

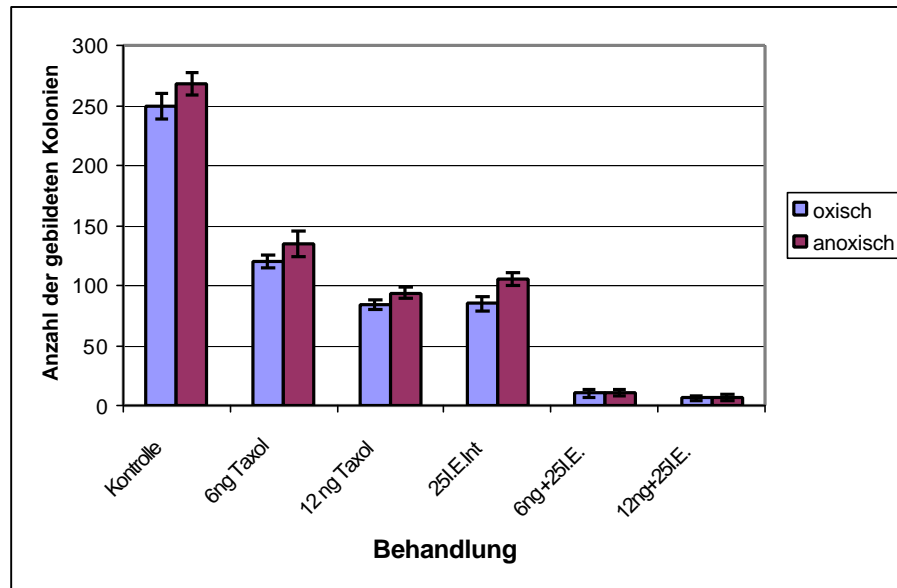
#### 3.1 Toxizität von Interferon und Taxol auf oxische und anoxische ZK 70-Mesotheliomzellen

Sowohl Interferon als auch Taxol wirken sich auf die Koloniebildung der ZK70- in den Konzentrationen 25 I.E.bzw. 6ng und 12 ng aus: Beide Substanzen reduzieren alleine die Koloniebildung um 50-60%. Kombinationen reduzieren die Koloniebildung auf unter 10%. Hypoxische Zellen verhalten sich dabei nicht unterschiedlich (Tab. 1 und Abb. 4, s. auch Tab.8 auf S. 80).

**Tab.1 Effekt von Interferon und Taxol auf die Koloniebildung bei oxischen und anoxischen ZK 70 Mesotheliomzellen**

	Anzahl der Kolonien			
	oxisch		anoxisch	
Behandlung	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	249,83	10,80	268,50	8,78
6ng Taxol	120,33	6,01	135,16	10,30
12 ng Taxol	84,33	4,57	94,00	4,54
25I.E.Int	85,00	5,65	105,50	5,12
6ng +25I.E.	10,50	3,30	11,50	2,98
12ng+25I.E.	6,83	2,26	7,16	2,26

MW=Mittelwert, SD= Standardabweichung



**Abb.4. Effekt von Interferon und Taxol sowie Kombinationen auf die Koloniebildung bei oxischen und anoxischen ZK 70 Mesotheliomzellen**

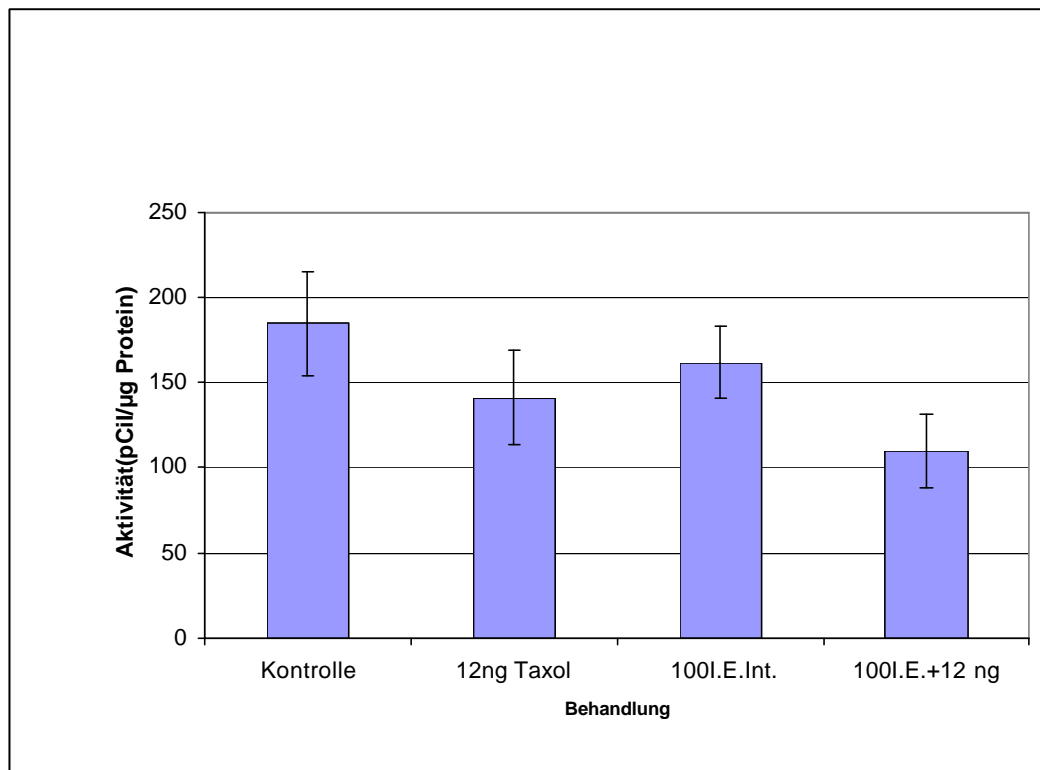
#### **Tritiumthymidininkorporation**

**Tab. 2 Effekt von Interferon und Taxol auf den Tritiumthymidineinbau**

Behandlung	Aktivität(pCi/µg Protein)	
	MW	SD
Kontrolle	184,13	30,59
12ng Taxol	140,78	27,59
100l.E.Int.	161,64	21,3
100l.E.+12 ng	109,52	21,3

MW=Mittelwert; SD= Standardabweichung

**Abb.5 Effekt von Interferon und Taxol auf den Tritiumthymidineinbau bei ZK 70 Mesotheliomzellen**



Die Tabelle und die Abb. 3.2 zeigen den Effekt von Interferon und Taxol sowie Kombinationen auf die Tritiumthymidininkorporation in die Mesotheliomzellen der Linie ZK 70. Interferon und Taxol haben keinen signifikanten Effekt, die Kombination zu einer Reduktion der Thymidininkorporation um 30%(s. auch Tab. 9 auf S. 81).

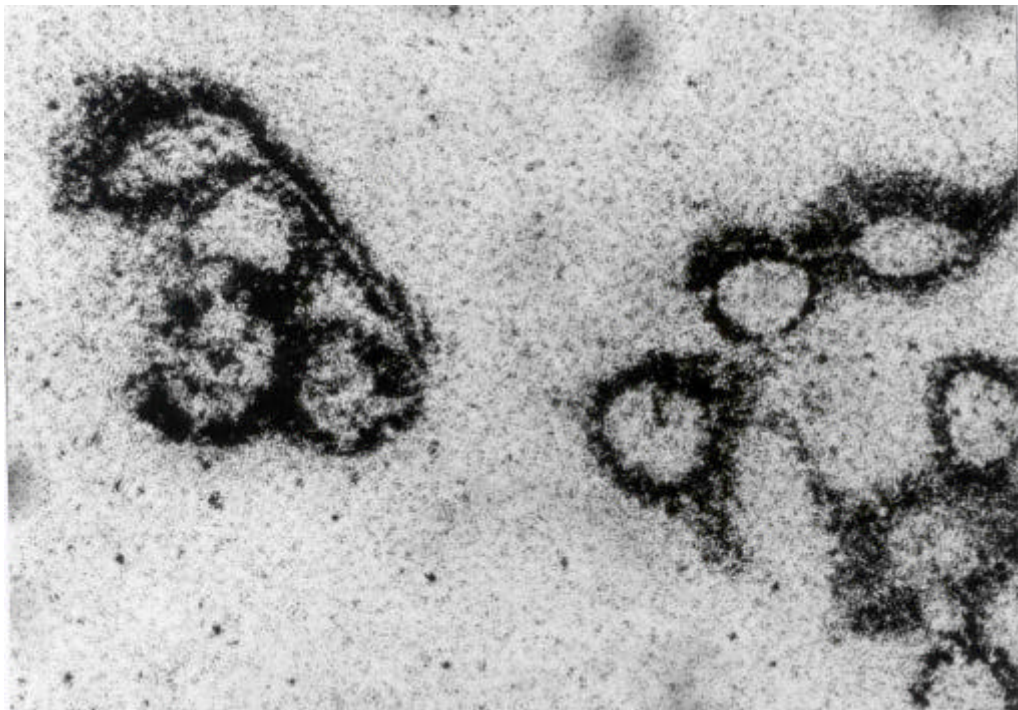


Kapitel 3.2-3.5 zeigen Autoradiografien unterschiedlicher Zelltypen mit Tritiumthymidin und Tritiumthymidinmonophosphat. Die Kapitel 3.6-3.7 stellen die Verteilung der beiden Tracer Tritiumthymidin und Tritiumthymidinmonophosphat in den Autoradiografien an 3 aufeinanderfolgenden Tagen dar. Im folgenden kommt die Mesotheliomlinie ZK 684 zur Darstellung, alle 4 in gleicher Weise untersuchten Mesotheliomlinien zeigten ein gleichartiges Verteilungsverhalten der Tracer. Alle fertiggestellten Autoradiografien wurden in 40facher Vergrößerung mikroskopiert und fotografiert. Die Darstellung erfolgte im gleichen Maßstab; Größenunterschiede der einzelnen Zelltypen bzw. gleicher Zelllinien unter Behandlung sind nicht auf unterschiedliche Vergrößerungsfaktoren bei der Darstellung zurückzuführen.

### **3.2 Autoradiografien unbehandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 643 mit Tritiumthymidin**

Die Autoradiografien unbehandelter Zellen der Mesotheliomlinie ZK 643 mit Tritiumthymidin am Tag 3 nach der Aussaat fallen in erster Linie durch die völlig fehlende Kerndarstellung auf. Es erfolgt eine Aufnahme des Tracers ausschließlich ins Cytoplasma (Abb. 6).

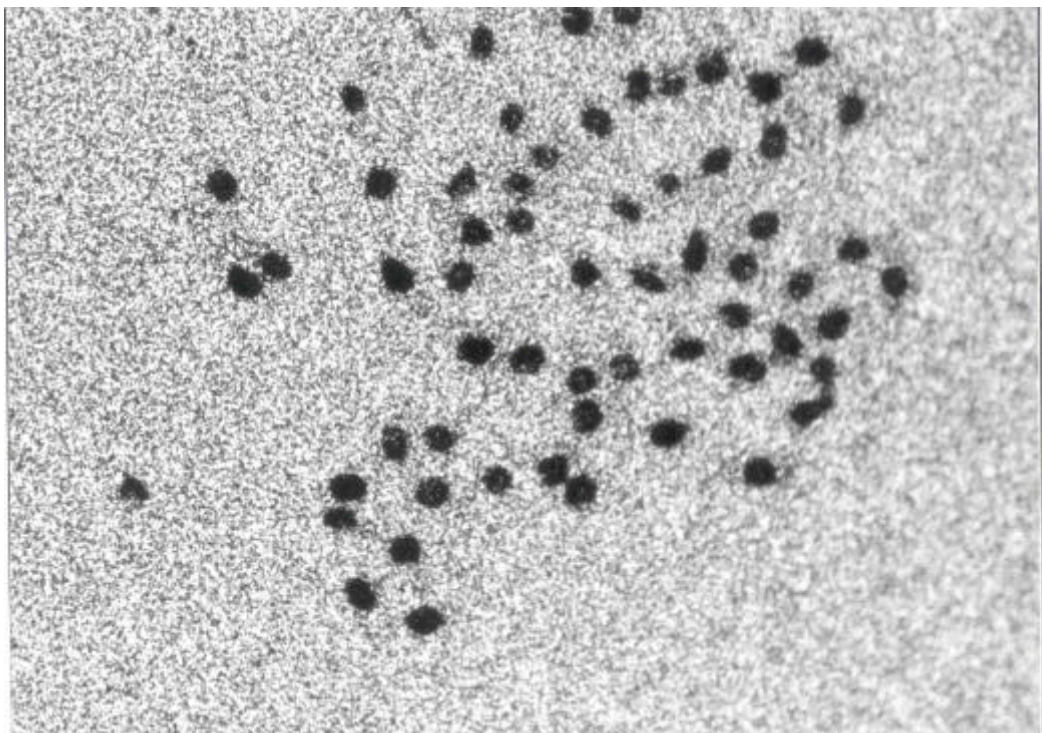
**Abb. 6 Autoradiografie mit Tritiumthymidin der Mesotheliomlinie ZK 643**



### **3.3 Autoradiografien der Ovarialcarcinomzelllinie sp3 mit Tritiumthymidin**

Unbehandelte Zellen der Ovarialcarcinomlinie sp3 am Tag 3 nach der Aussaat nehmen den Tracer Tritiumthymidin ausschließlich in die Zellkerne auf(Abb. 7).

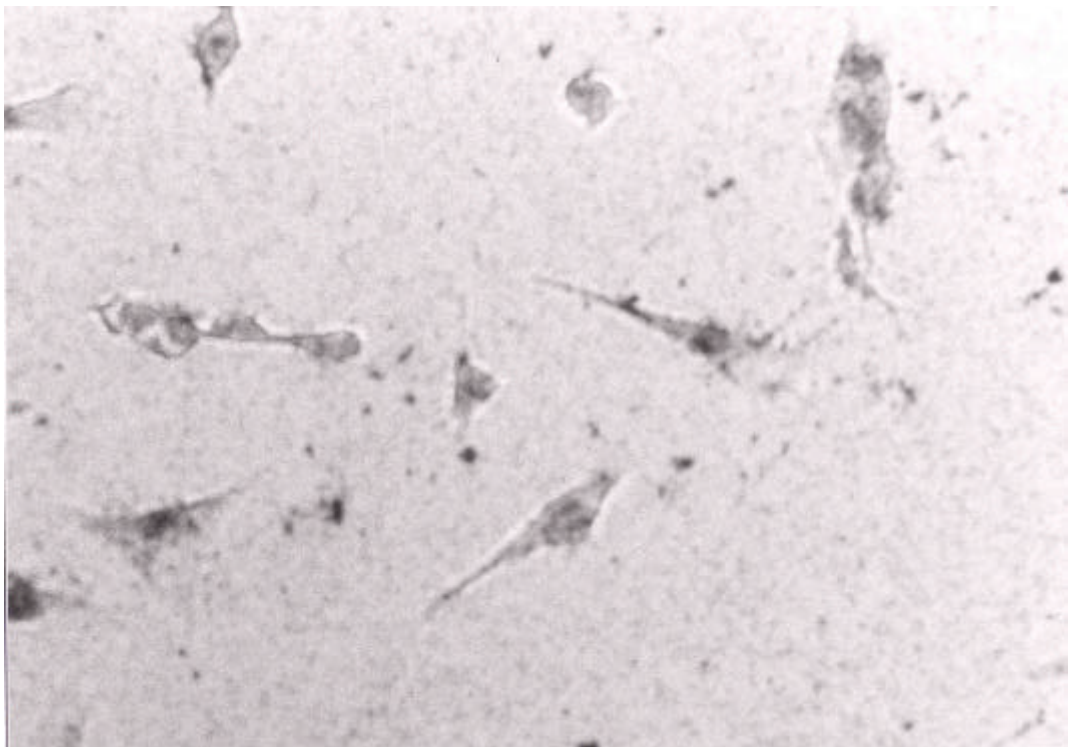
**Abb. 7 Autoradiografie unbehandelter Ovarialcarcinomzellen(Linie sp3) mit Tritiumthymidin**



### **3.4 Autoradiografien benigner Mesothelzellen mit Tritiumthymidin**

Die folgende Abbildung(8) zeigt eine benigne Mesothelzelle ohne Behandlung nach Exposition mit Tritiumthymidin am Tag 3 nach der Aussaat. Ein Einbau in die Zellkerne findet in geringem Umfang statt, ebenso ein geringer Einbau ins Cytoplasma.

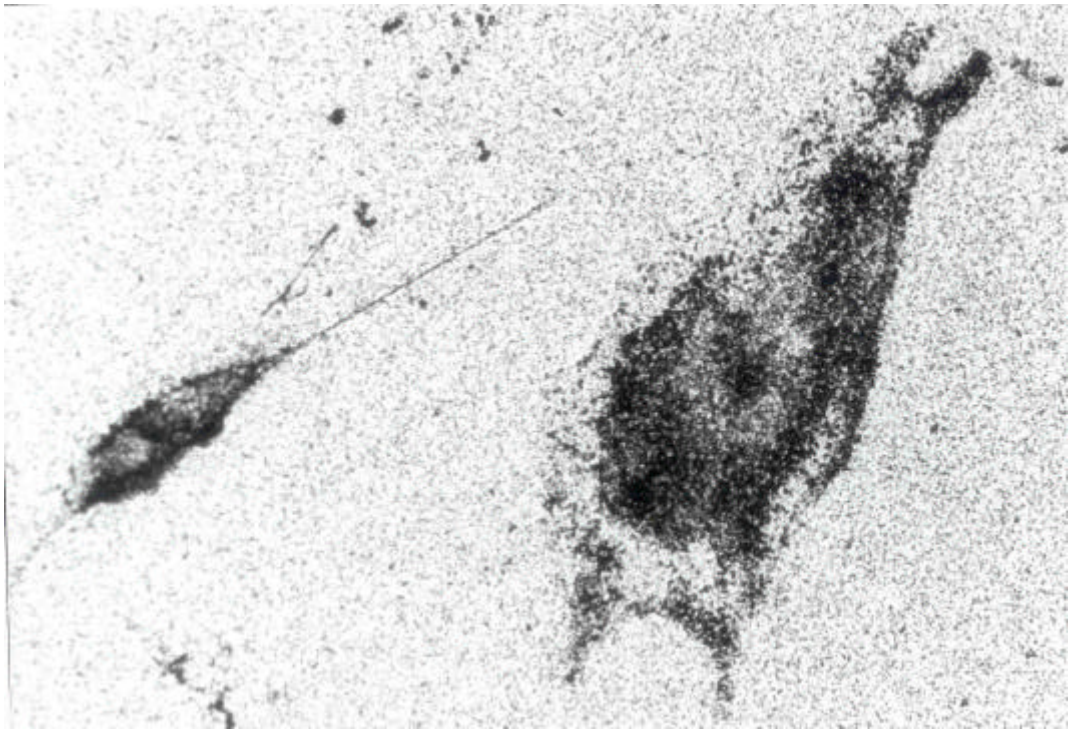
**Abb. 8 Autoradiografie benigner Mesothelzellen mit Tritiumthymidin**



### **3.5 Autoradiografien benigner Mesothelzellen mit Tritiumthymidinmonophosphat**

Im Zentrum der Abbildung(9 ) steht eine benigne Mesothelzelle der gleichen Linie wie 3.4 ohne Behandlung nach Exposition mit Tritiumthymidinmonophosphat am Tag 3 nach der Aussaat. Es findet eine deutliche Markierung des Kerns und auch eine Aufnahme des Tracers ins Cytoplasma statt.

**Abb.9 Autoradiografie benigner Mesothelzellen mit Tritiumthymidinmonophosphat**



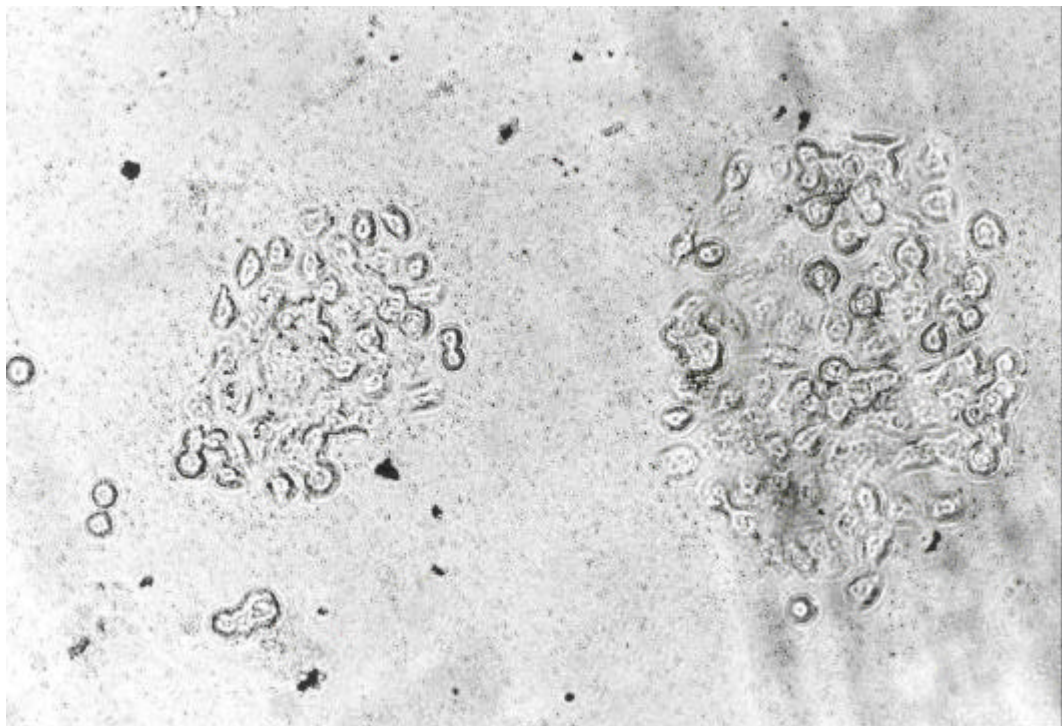


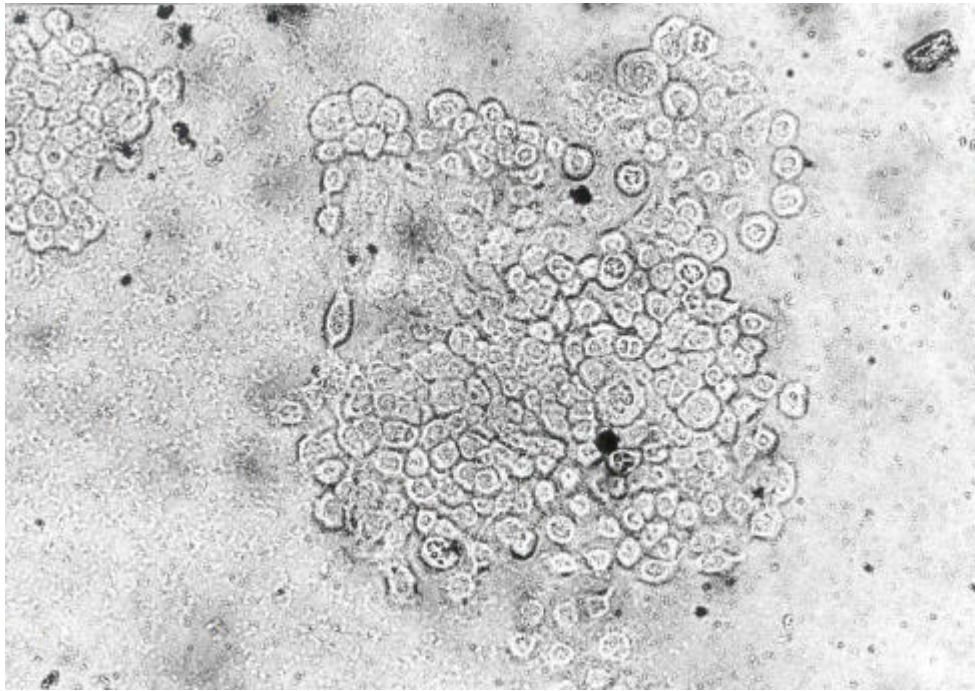
### **3.6 Autoradiografien der Mesotheliomlinie ZK 684 mit Tritiumthymidin**

#### **3.6.1 Unbehandelte Zellen**

Die folgenden Abbildungen (10-12) zeigen Autoradiografien unbehandelter Mesotheliomzellen der Zelllinie ZK 684 an den drei auf die Aussaat folgenden Tagen. Als Tracer wurde Tritiumthymidin eingesetzt. Die Zellzahl in den Petrischalen nimmt im Verlauf von Tag 1-Tag 3 zu; jedoch ohne erkennbare Markierung der Zellkerne. Diese weisen keinerlei Inkorporation des Tracers auf. Eine geringe Aufnahme des Tracers ins Cytoplasma ist hingegen erkennbar. Diese nimmt innerhalb der Beobachtungstage etwas zu.

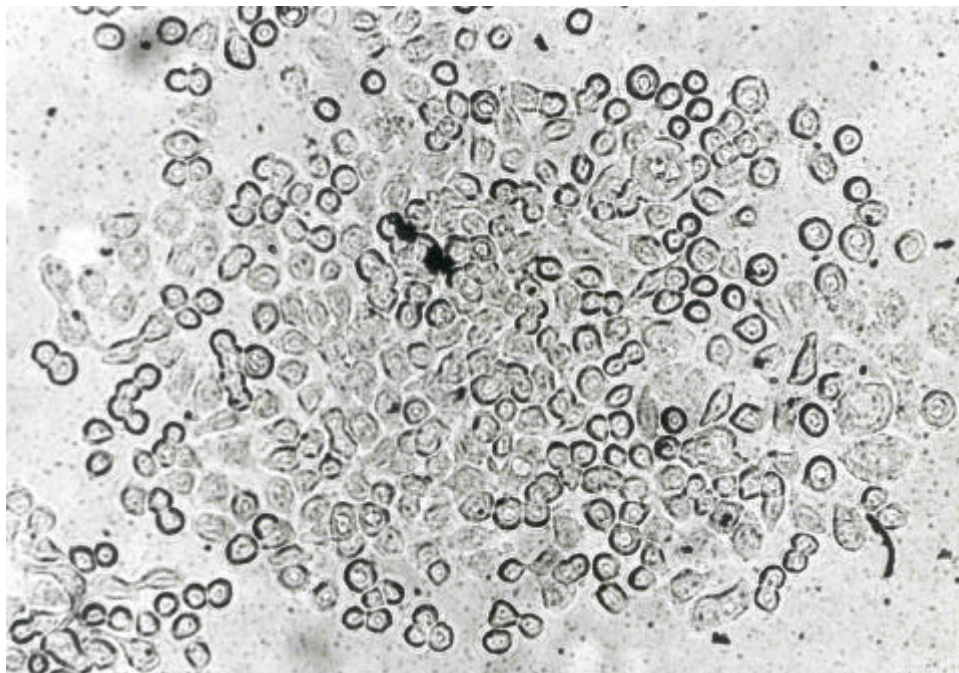
**Abb 10 Autoradiografie mit Tritiumthymidin unbehandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am 1. Expositionstag**





**Abb.11 Autoradiografie mit Tritiumthymidin unbehandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am zweiten Expositionstag**

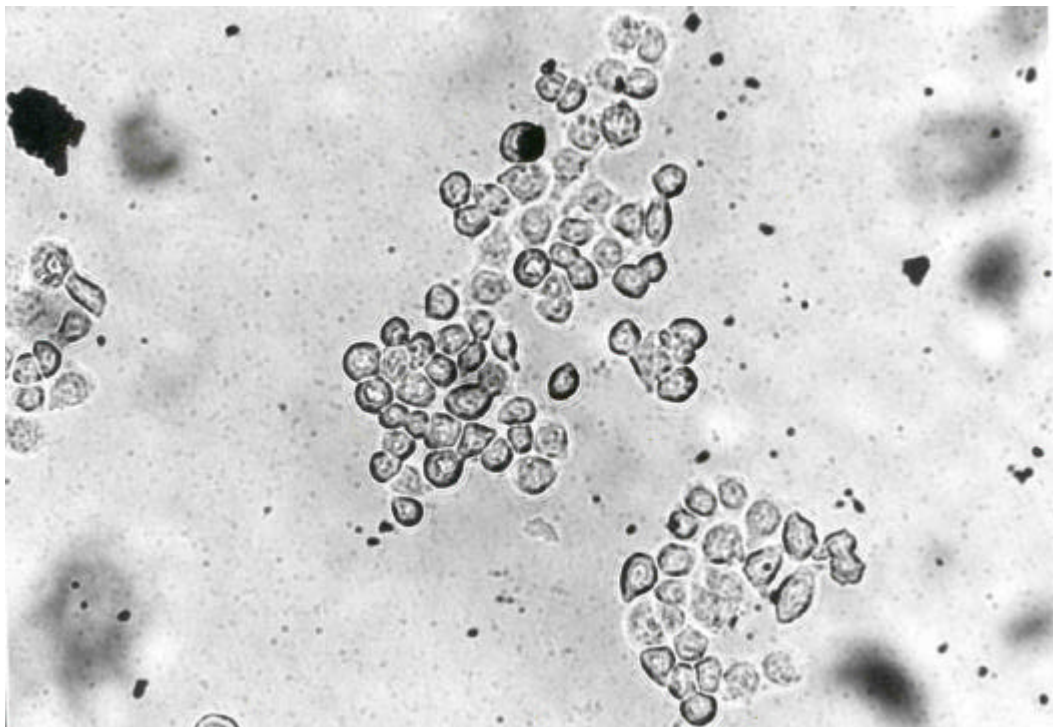
**Abb.12 Autoradiografie mit Tritiumthymidin unbehandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am dritten Expositionstag**



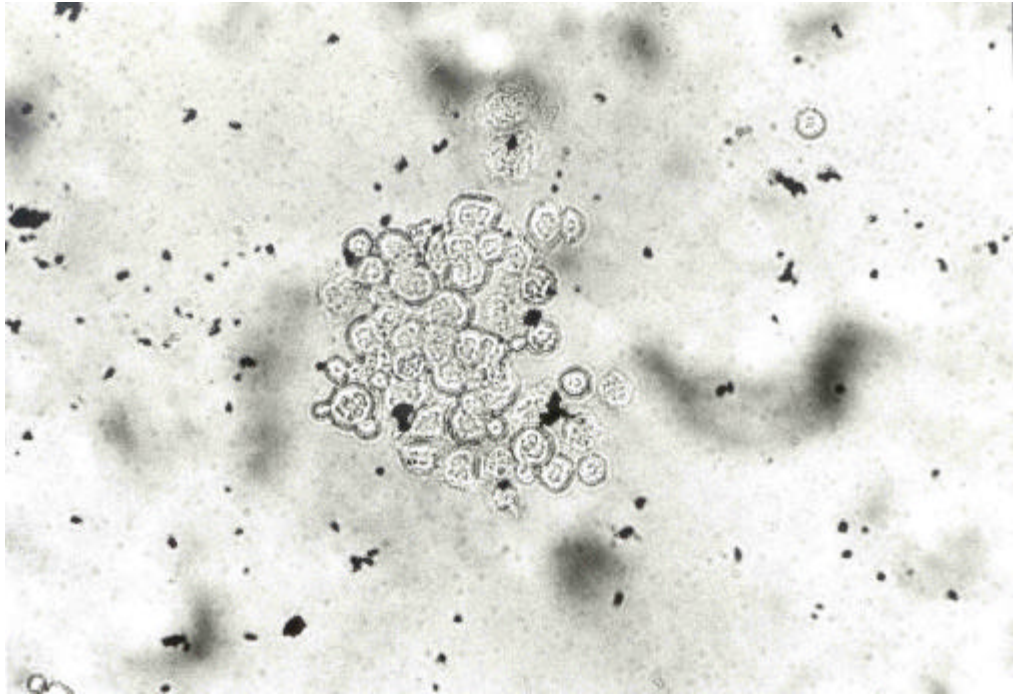
### **3.6.2 nach Interferon**

Die Autoradiografien mit dem Tracer Tritium-Thymidin Interferon-Beta-behandelter Zellen der Mesotheliomlinie ZK 684 an den drei auf die Aussaat und Zugabe des Interferon(100 I.E./ml Kulturmedium) folgenden Tagen zeigen keine Kernmarkierung. Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen nimmt die Zellzahl nicht erkennbar zu. Eine leichte Schwärzung des Cytoplasmas ist ebenfalls erkennbar.

**Abb. 13 Autoradiografie mit Tritiumthymidin Interferon-behandelter Zellen der Linie ZK 684 am ersten Expositionstag**

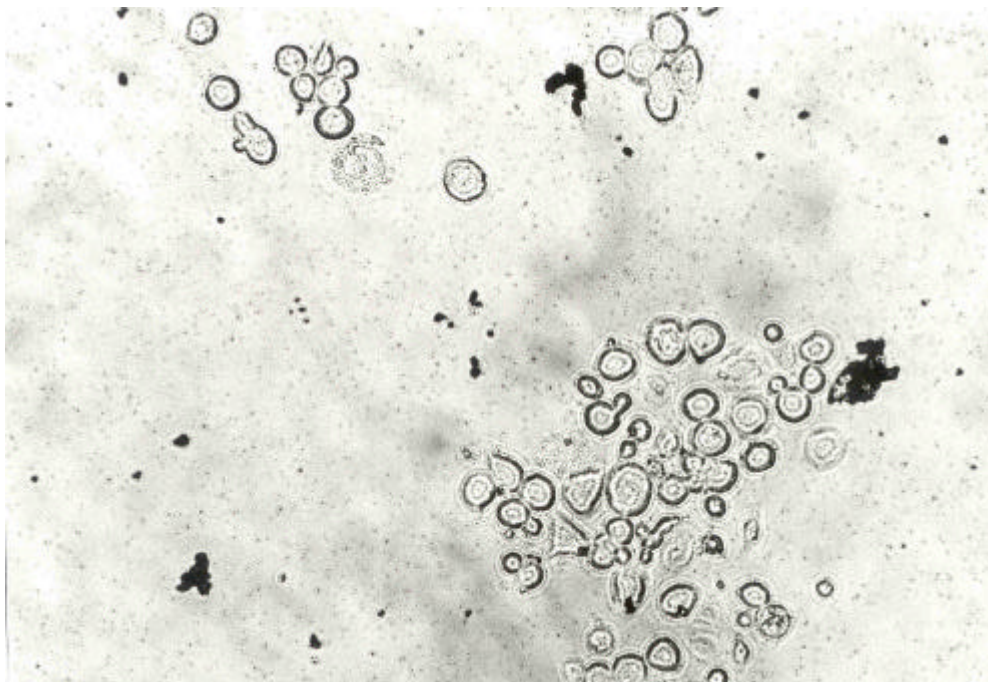






**Abb. 14 Autoradiografie Interferon-behandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am zweiten Expositionstag**

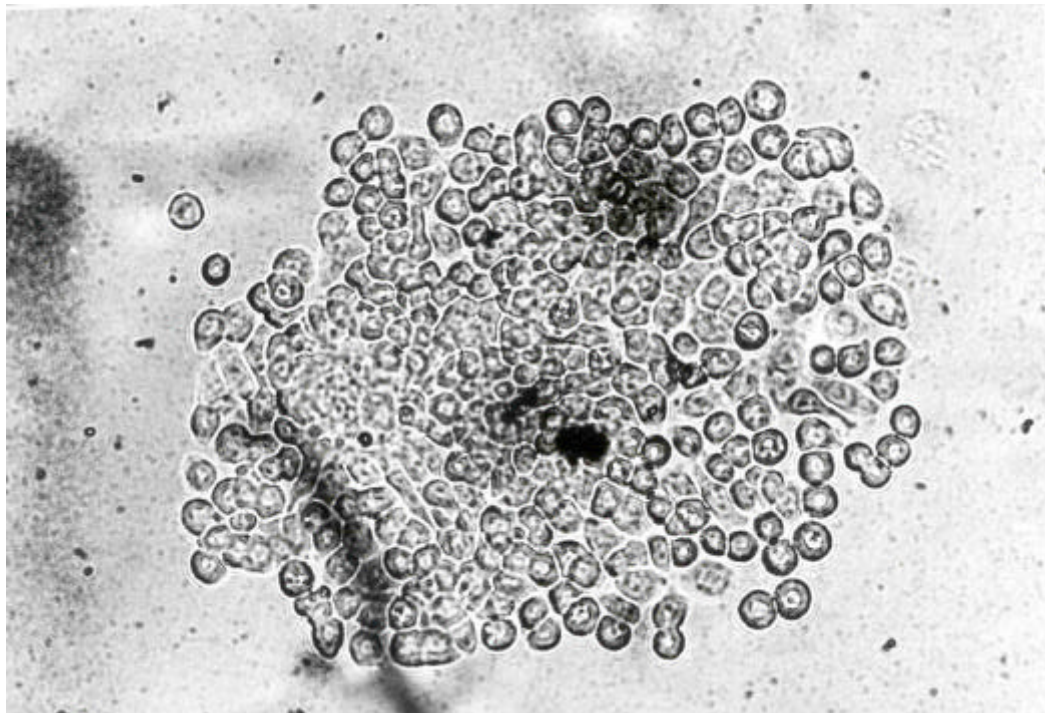
**Abb.15 Autoradiografie mit Tritiumthymidin Interferon-behandelter Mesotheliomzellen am dritten Expositionstag**



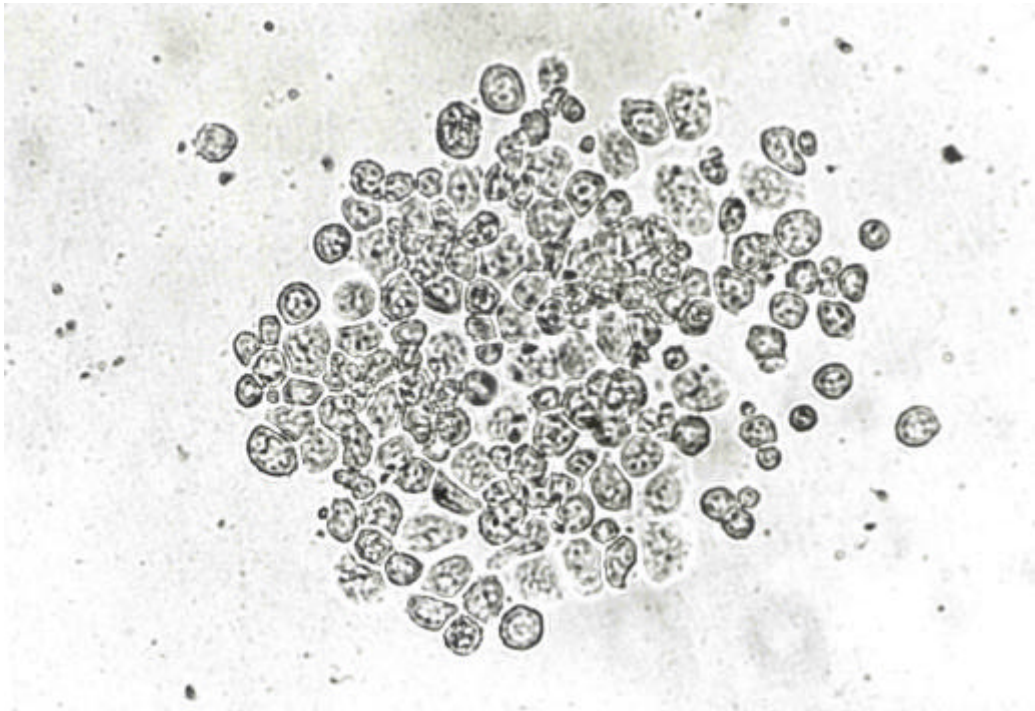
### **3.6.3 nach Taxol**

Nachfolgend (Abb. 16-18) sind Autoradiografien Taxol-behandelter Zellen der Mesotheliomlinie ZK 684 an den drei auf die Aussaat und Taxolzugabe folgenden Tage abgebildet. Als Tracer diente wiederum Tritiumthymidin; Taxol wurde in der Konzentration 12ng/ml Kulturmedium eingesetzt. Man beobachtet am ersten Tag wiederum eine Schwärzung des Cytoplasmas bei gleichzeitiger Aussparung der Zellkerne. Die Schwärzung des Cytoplasmas ist im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas verstärkt. Diese nimmt am zweiten Expositionstag noch zu; die Kerne sind schlechter abgrenzbar, jedoch nicht markiert. Der Zellverband löst sich auf und Schwankungen der Zellgröße sind zu verzeichnen.

**Abb.16 Tag 1 Autoradiografie mit Tritiumthymidin Taxol-behandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684**

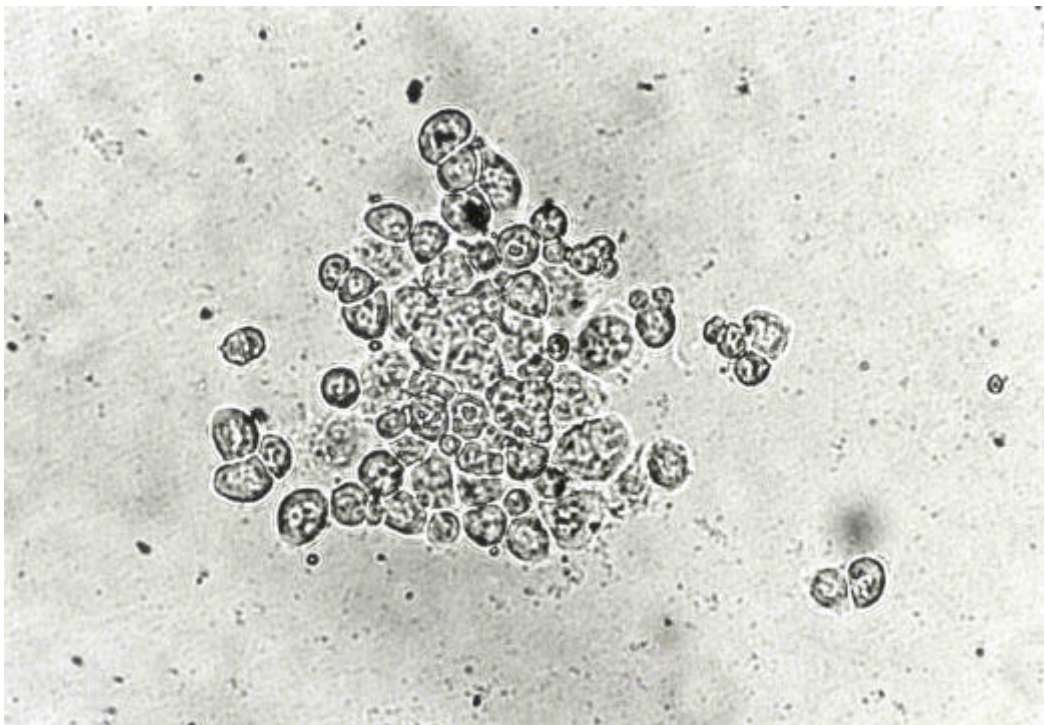






**Abb. 17 Autoradiografien mit Tritiumthymidin Taxol-behandelter  
Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am zweiten Expositionstag**

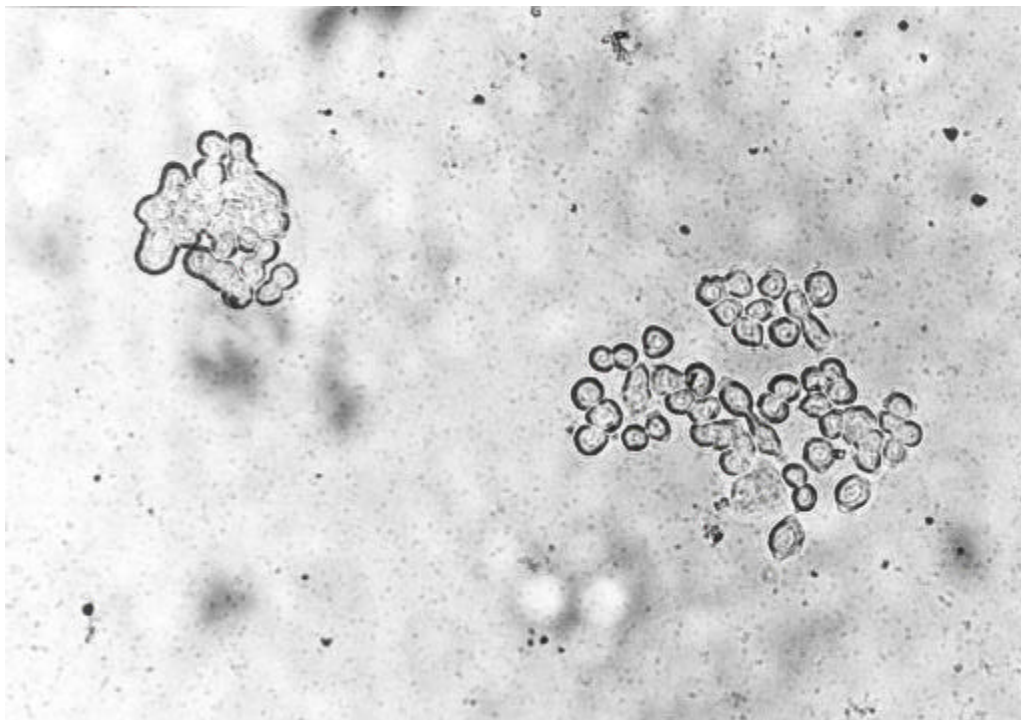
**Abb. 18 Autoradiografien mit Tritiumthymidin Taxol-behandelter  
Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am dritten Expositionstag**



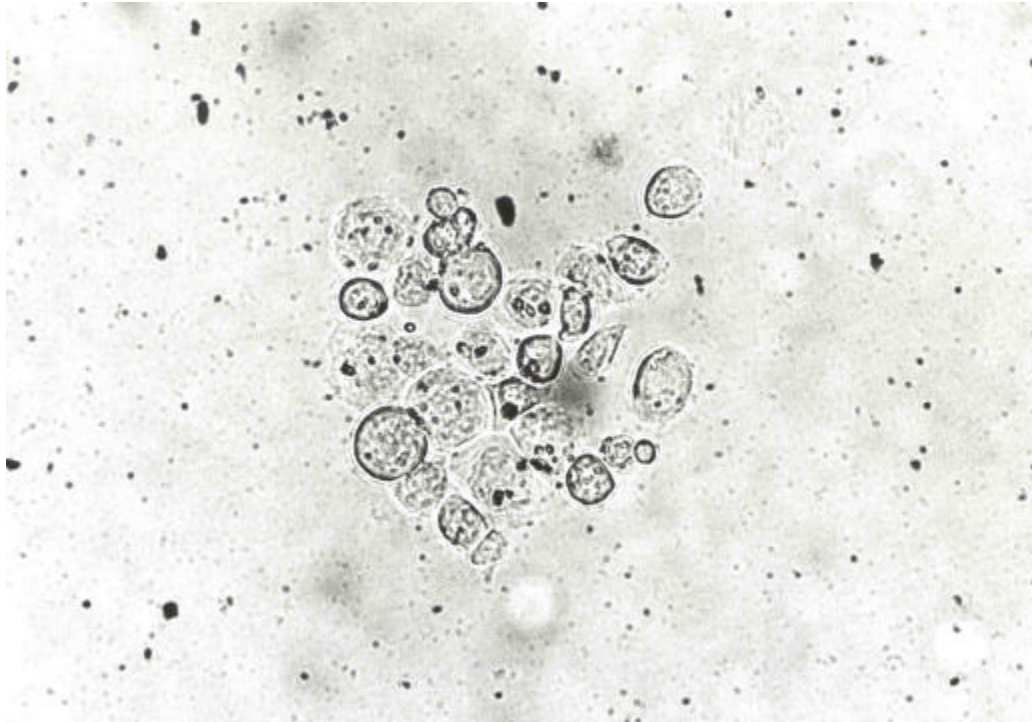
### 3.6.4 nach Interferon-und Taxol

Die Autoradiografien Interferon(100I.E./ml Kulturmedium)- und Taxol(12ng/mlKulturmedium)-behandelter Zellen an den drei auf die Aussaat und Zugabe des Interferon und Taxol folgenden Tage lassen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe stark verminderte Zellzahl und schwere morphologische Schädigungen der Zellen erkennen. Am ersten Expositionstag findet sich eine Schwärzung des Cytoplasmas. Eine Kernmarkierung kommt nicht zur Darstellung. Ab dem zweiten Tag kommen Schwankungen der Zellform-und gröÙe hinzu. Am zweiten Tag sind die Zellen eher vergrößert, am dritten Tag steht die Schrumpfung im Vordergrund.

**Abb.19. Autoradiografie mit Tritiumthymidin Interferon-und-Taxol-behandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am ersten Expositionstag**

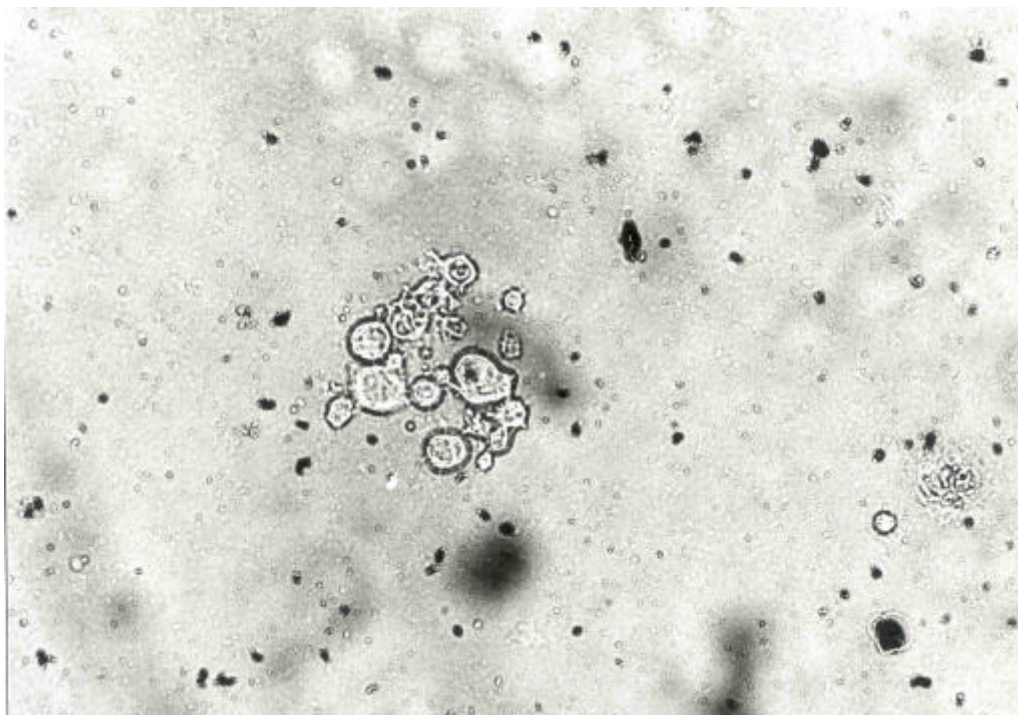






**Abb. 20 Autoradiografie mit Tritiumthymidin Interferon-und Taxol- behandelter -  
Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am Tag 2**

**Abb.21 Autoradiografie mit Tritiumthymidin Interferon-und Taxol- behandelter  
Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am Tag 3**

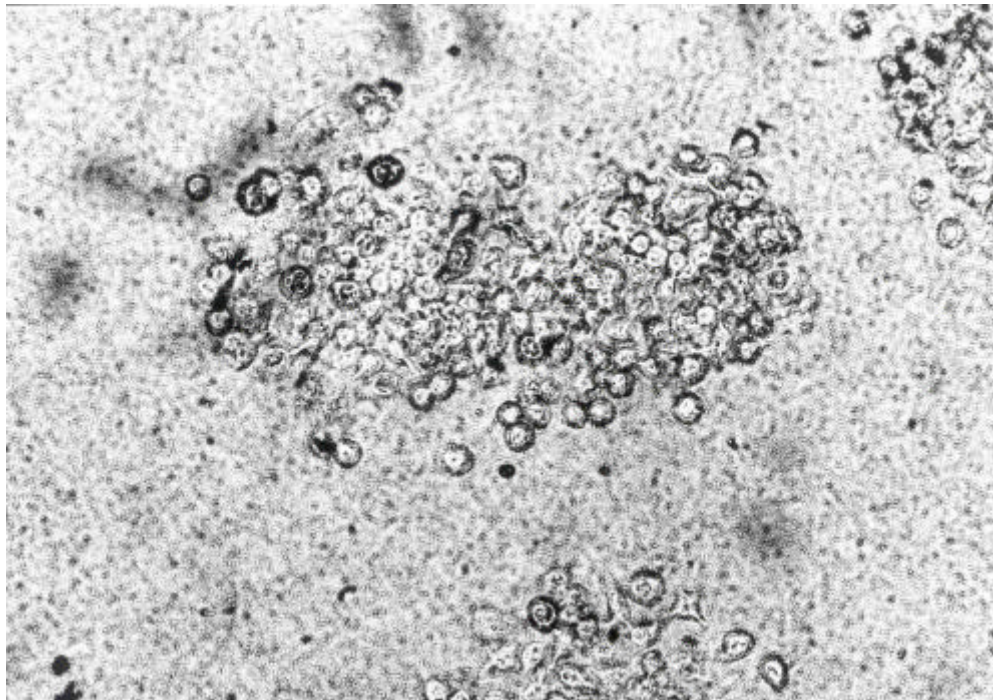


### **3.7 Autoradiografien der Mesotheliomlinie ZK 684 mit Tritiumthymidinmonophosphat**

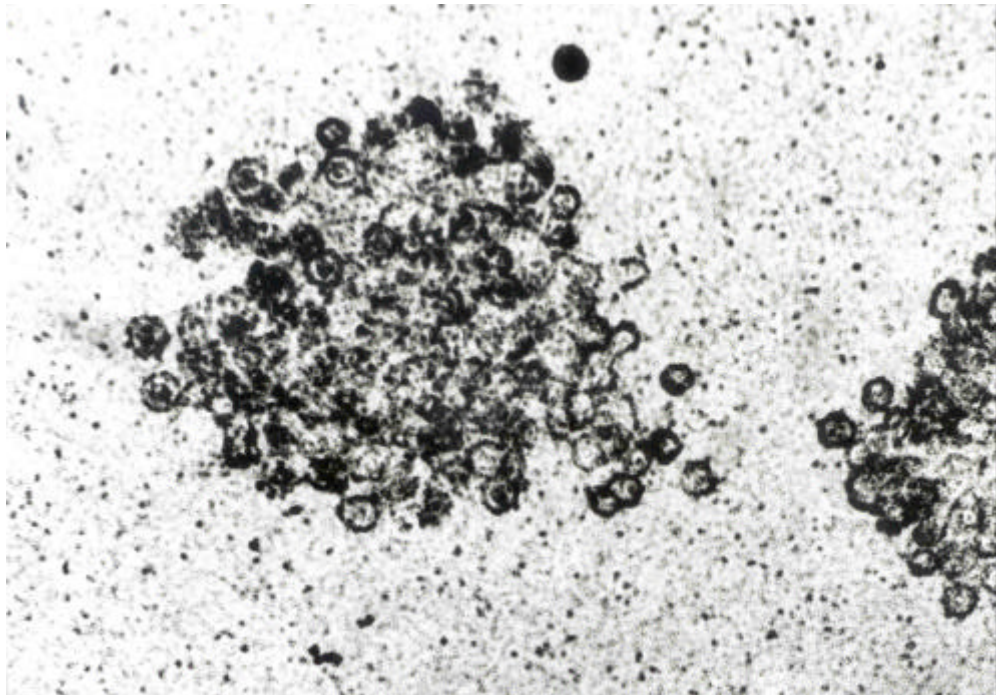
#### **3.7.1 Unbehandelte Zellen**

Autoradiografien unbehandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 mit Tritiumthymidinmonophosphat an den drei auf die Aussaat folgenden Tagen lassen eine deutliche Schwärzung des Cytoplasmas erkennen. Die Kernmarkierung nimmt im Verlauf der drei Beobachtungstage kontinuierlich zu. Parallel dazu erhöht sich die Zelldichte.

**Abb.22 Autoradiografie mit Tritiumthymidinmonophosphat unbehandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am Tag 1**

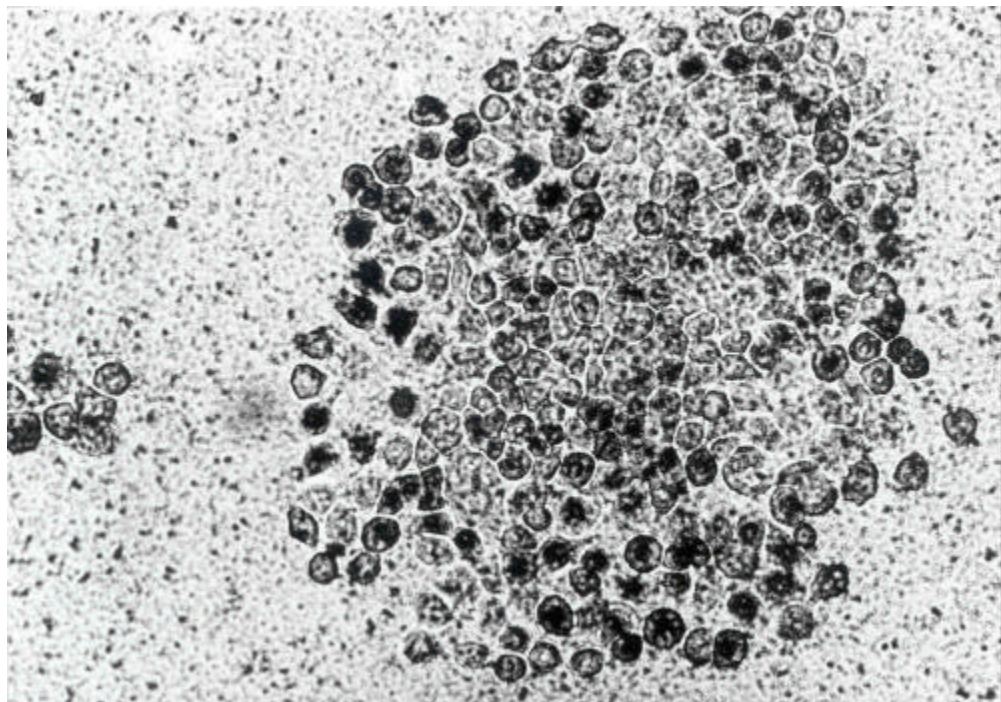






**Abb.23 Autoradiografien mit Tritiumthymidinmonophosphat unbehandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am Tag 2**

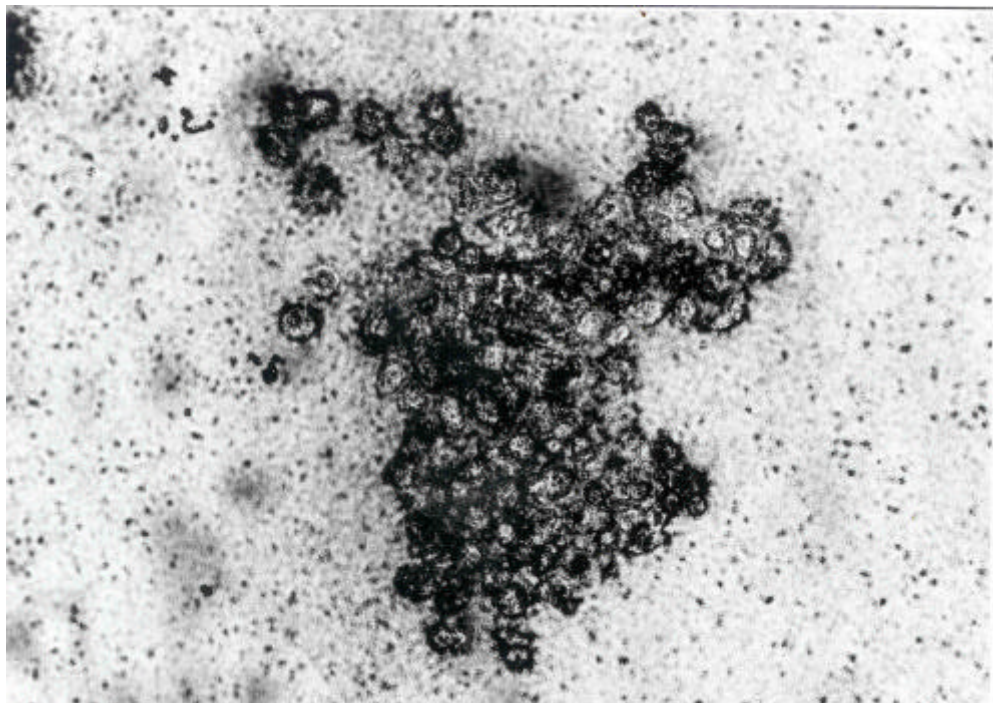
**Abb.24 Autoradiografie mit Tritiumthymidinmonophosphat unbehandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am Tag 3**



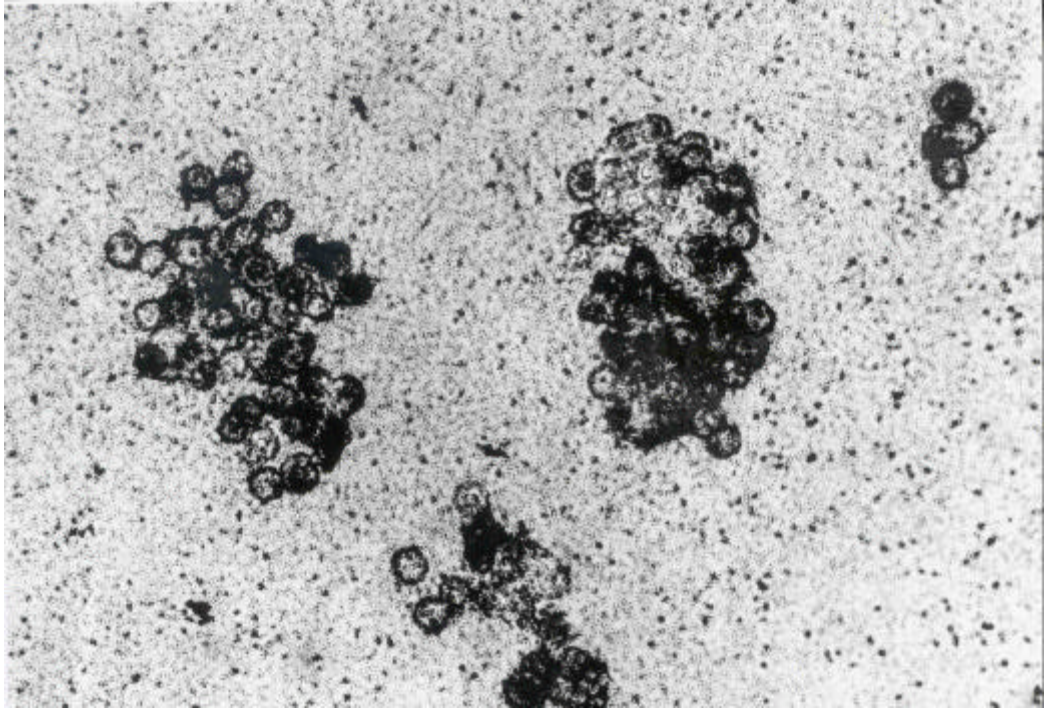
### **3.7.2 nach Interferon**

In den folgenden Abbildungen kommen Autoradiografien mit Interferon(100I.E./ml Kulturmedium) behandelter Mesotheliomzellen der Zelllinie ZK 684 an den auf die Aussaat und Interferonzugabe folgenden drei Tagen zur Darstellung. Zunächst kommt es zu einer erheblich vermehrten Schwärzung des Cytoplasmas , die nach 3 Tagen wieder rückläufig ist. Die Interferon-behandelten Zellen zeigen am dritten Expositionstag keine Kernmarkierung mehr.

**Abb.25 Autoradiografie mit Tritiumthymidinmonophosphat Interferon-behandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am Tag1**

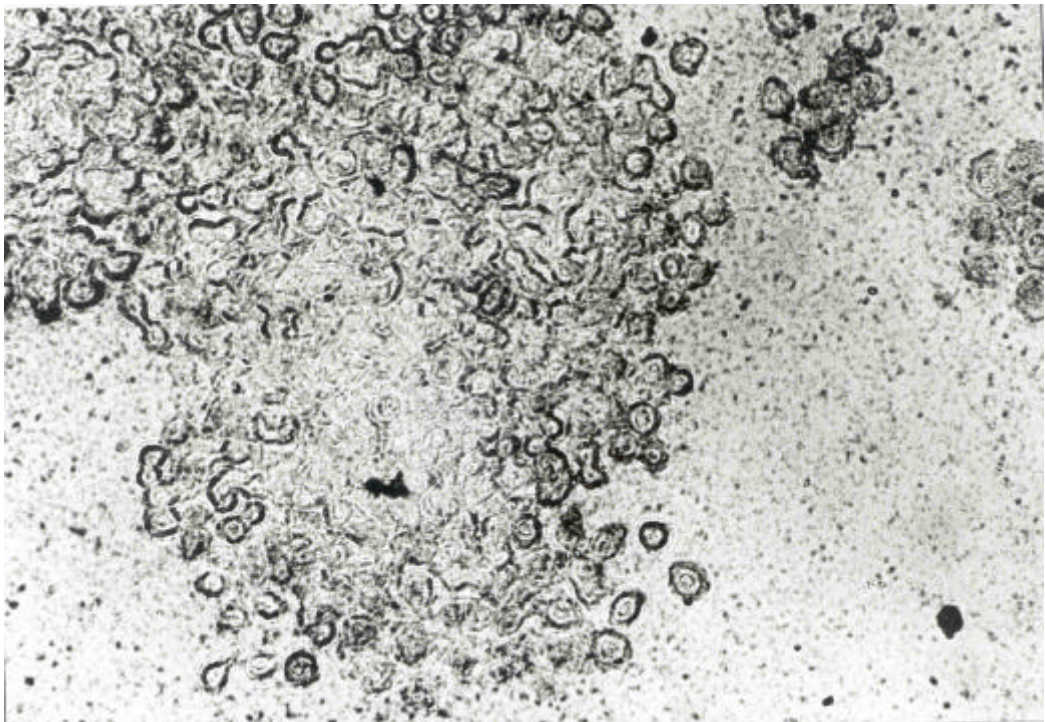






**Abb.26 Autoradiografien mit Tritiumthymidinmonophosphat Interferon-behandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684**

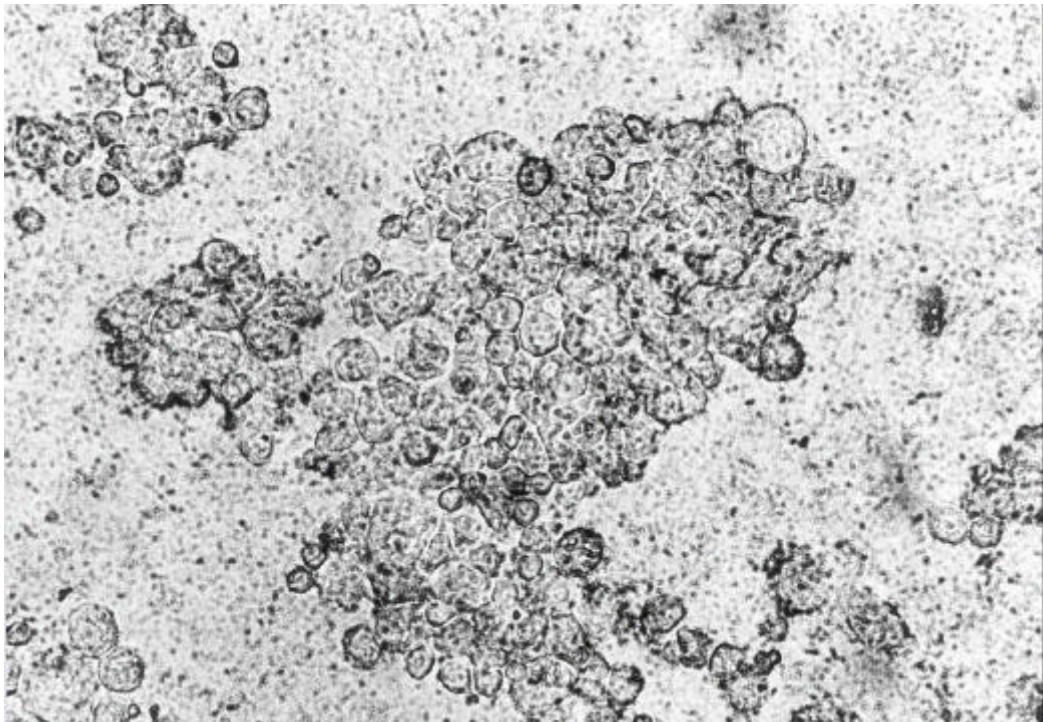
**Abb. 27 Autoradiografien mit Tritiumthymidinmonophosphat Interferon-behandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am Tag 3**



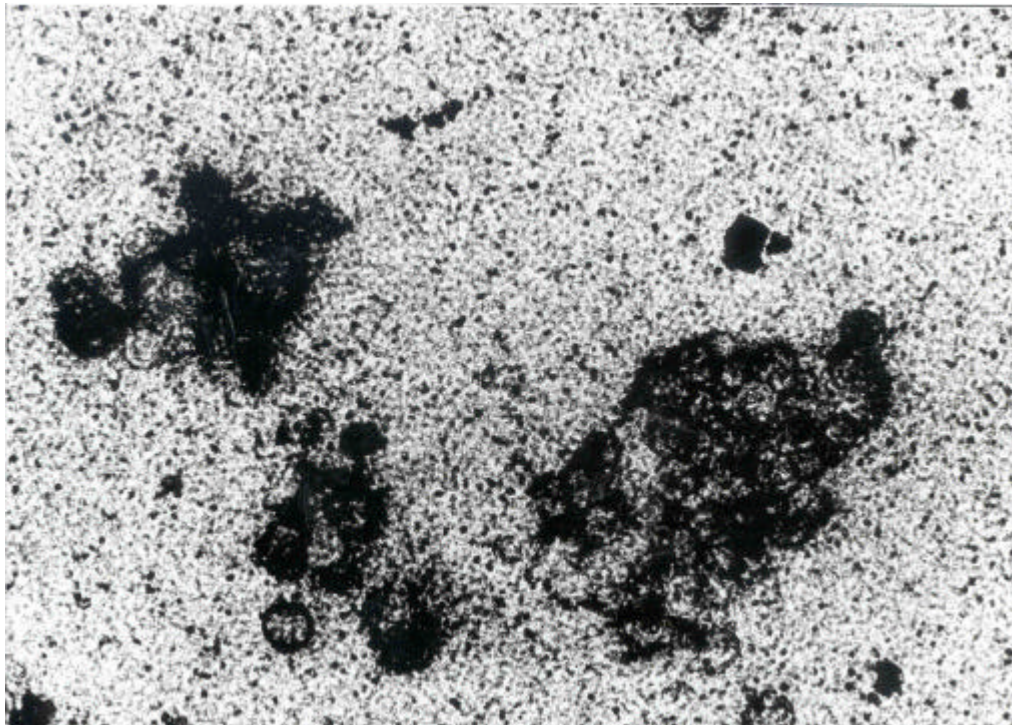
### **3.7.3 nach Taxol**

Die autoradiografisch mit Tritiumthymidinmonophosphat als Tracer dargestellten mit Taxol(12ng/mlKulturmedium) behandelten Zellen(Abb.28-30) weisen am ersten Expositionstag nach der Aussaat und Taxolzugabe nur eine geringe Aufnahme des Tracers auf. Am zweiten Expositionstag nimmt die Schwärzung des Cytoplasmas massiv zu; am dritten Tag ist keine Kernmarkierung zu verzeichnen.

**Abb 28 Autoradiografie Taxol-behandelter Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 am Tag 1**

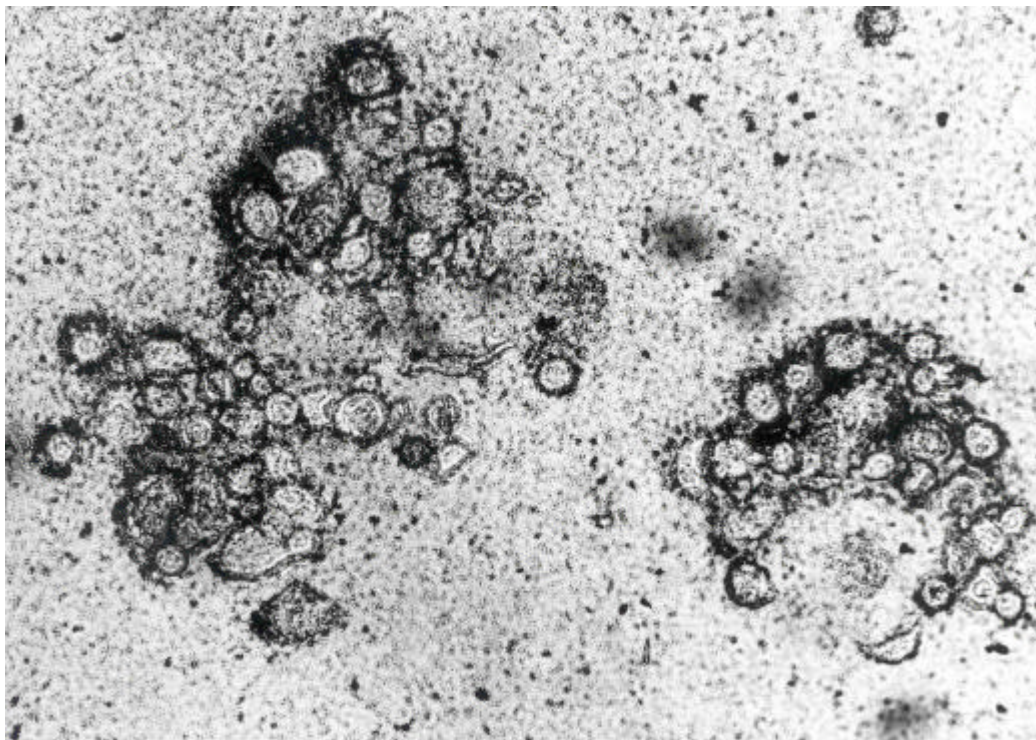






**Abb.29 Autoradiografie Taxol-behandelter Zellen der Linie Zk 684 mit Tritiumthymidinmonophosphat am Tag 2**

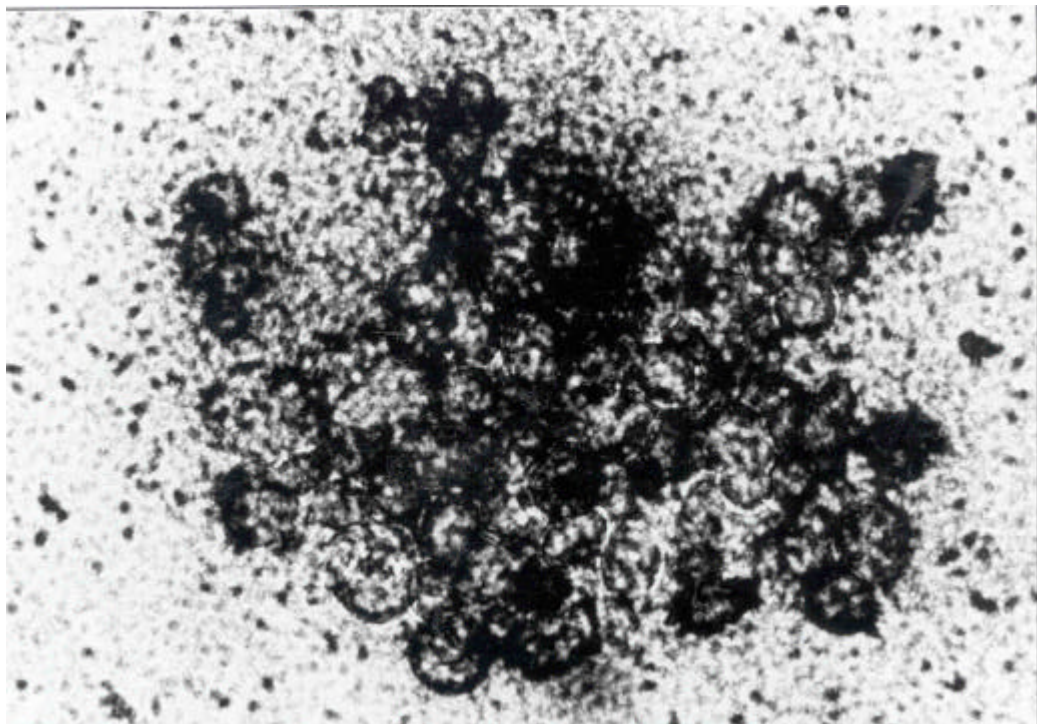
**Abb. 30 Autoradiografie Taxol-behandeltem Mesotheliomzellen der Linie ZK 684 mit Tag3 mit Tritiumthymidinmonophosphat**



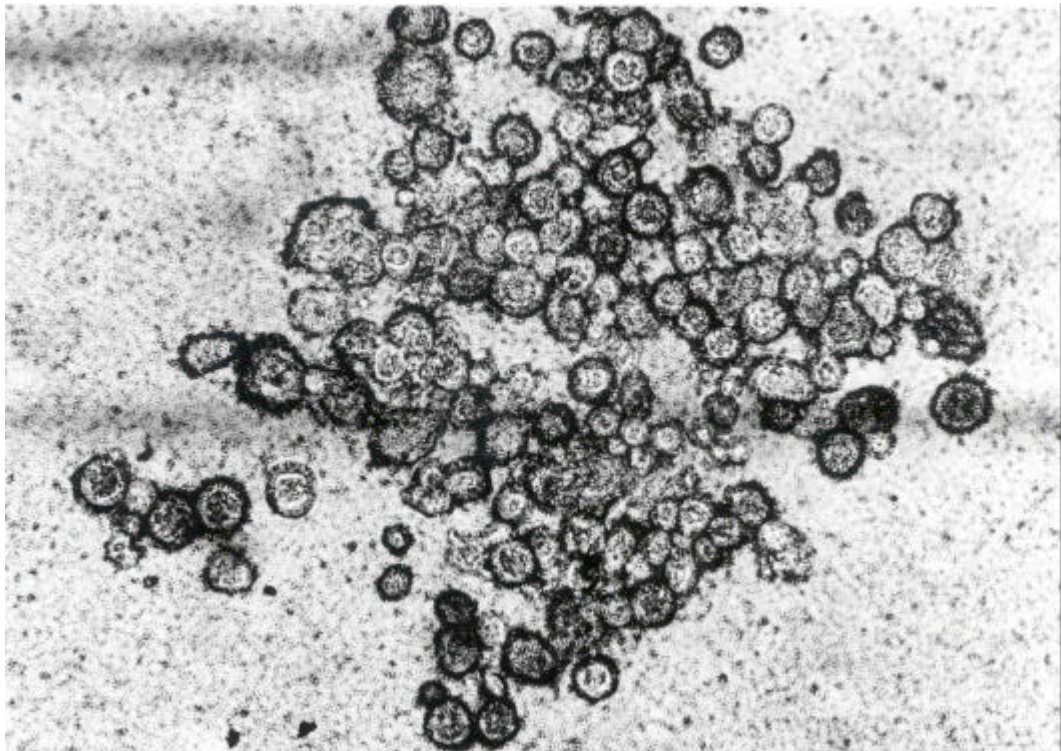
#### **3.7.4 nach Interferon und Taxol**

Die Autoradiografien mit Interferon und Taxol behandelter Zellen der Mesothelionlinie ZK 684 mit Tritiumthymidinmonophosphat weisen am ersten der drei auf die Aussaat und Zugabe des Interferon(100I.E./mlKulturmedium) und Taxol(12ng/mlKulturmedium) folgenden Tagen eine massive Zunahme der Schwärzung des Cytoplasmas auf. Diese ist am zweiten Tag etwas rückläufig. Am dritten Tag sind die Zellen wiederum morphologisch verändert mit starker Zunahme des Volumens der verbliebenen Zellen bzw. Zelltrümmern.

**Abb.31 Autoradiografie Interferon-und Taxol-behandelter Zellen der Linie ZK 684 am Tag 1 mit Tritiumthymidinmonophosphat**

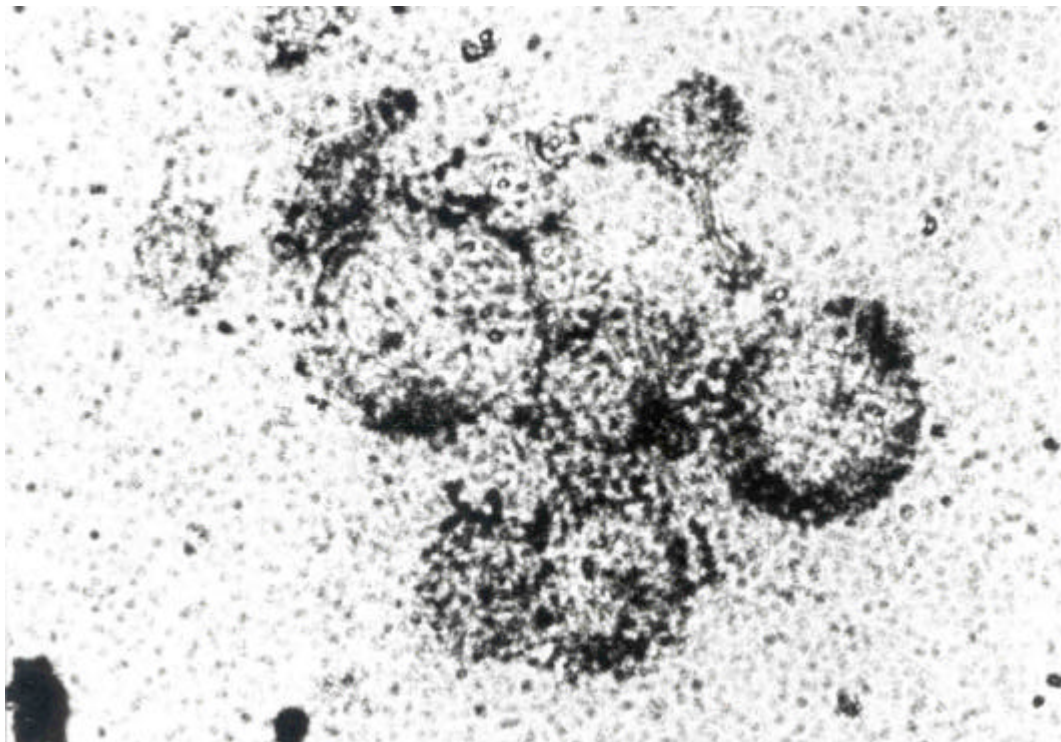






**Abb.32 Autoradiografie Interferon-und Taxol-behandelter Zellen der Linie ZK 684 am Tag2 mit Tritiumthymidinmonophosphat**

**Abb. 33 Autoradiografie Interferon-und Taxol-behandelter Zellen der Linie ZK 684 am Tag 3 mit Tritiumthymidinmonophosphat**



Bei den unbehandelten Mesotheliomzellen zeigt sich an den drei aufeinanderfolgenden Tagen eine Zunahme der Zellzahl. Die Mesotheliomzellen bilden Kolonien. Tritiumthymidin wird in die Mesotheliomzellen inkorporiert; eine Kernmarkierung ist jedoch an keinem der drei Untersuchungstage zu erkennen. Die Inkorporation ins Cytoplasma wird im Verlauf deutlicher. Die Zellkerne erscheinen als zentrale Aufhellung in der randständigen Schwärzung des Cytoplasmas.

Bei der Markierung unbehandelter Mesotheliomzellen mit Tritiumthymidinmonophosphat an den drei auf die Aussaat folgenden Tagen zeigt sich wiederum ein Anwachsen der Kolonien. Eine Inkorporation des Tracers findet an allen Untersuchungstagen statt. Am ersten auf die Aussaat folgenden Tag zeigt sich überwiegend eine Markierung des Cytoplasmas mit zentralen, den Zellkernen entsprechenden Aufhellungen. Nur einzelne Kerne sind markiert. Im Verlauf der beiden nächsten Tage nimmt die Kernmarkierung zu und tritt in den Vordergrund.

Nach Zugabe von Interferon sistiert die Zellproliferation, was sich in der geringen Zellzahl niederschlägt. Eine Inkorporation des Tritiumthymidin findet dennoch statt. Die Schwärzung des Cytoplasmas ist am ersten Tag besonders deutlich. Eine Kernmarkierung fehlt wiederum. Zusätzlich treten am dritten Tag Schwankungen in der Zellgröße auf. Einige Zellen weisen ein deutlich verkleinertes Volumen auf.

Tritiumthymidinmonophosphat wird am ersten Expositionstag ebenfalls am stärksten in die Interferon-behandelten Mesotheliomzellen inkorporiert. Der Einbau erfolgt überwiegend ins Cytoplasma, daneben findet eine geringe Kernmarkierung statt. Im Verlauf der beiden folgenden Tage nimmt die Inkorporation ins Cytoplasma wieder ab; eine Kernmarkierung findet am dritten Tag nicht mehr statt.

Taxol-behandelte Mesotheliomzellen zeigen am ersten Expositionstag eine verstärkte Inkorporation von Tritiumthymidin ins Cytoplasma ohne begleitende Kernmarkierung. Der Tracer ist zum Teil grobschollig verteilt. Die Zellkerne erscheinen wiederum als zentrale Aufhellung. An den beiden folgenden Tagen treten morphologische Veränderungen ein; der Zellverband bricht auseinander und das Zellvolumen schwankt. Die Mesotheliomzellen sind gegenüber der Kontrollgruppe aufgetrieben oder geschrumpft. Die intrazelluläre Verteilung des Tracers wird deutlich inhomogener mit grobscholligen Schwärzungen.

Taxol-behandelte Mesotheliomzellen nehmen Tritiumthymidinmonophosphat am ersten Expositionstag ebenfalls in geringen Umfang ins Cytoplasma auf. Die intrazelluläre Verteilung ist wiederum grobschollig. An den beiden folgenden Tagen nimmt die Inkorporation deutlich zu. Am zweiten Expositionstag sind die Mesotheliomzellen nahezu vollständig geschwärzt. Am dritten Expositionstag zeigen sich ringförmige Ablagerungen des Tracers im Cytoplasma. Allerdings sind nur die gegenüber den Kontrollzellen massiv aufgetriebenen Mesotheliomzellen dargestellt. Die unter Taxol-Behandlung geschrumpften Mesotheliomzellen stellen sich nicht dar.

Mesotheliomzellen, die mit Kombinationen aus Interferon und Taxol behandelt wurden, zeigen lediglich am ersten Expositionstag eine geringe Inkorporation von Tritiumthymidin ins Cytoplasma. Bereits am zweiten Expositionstag treten erhebliche morphologische Veränderungen auf. Das Zellvolumen ist vergrößert, die Zellen sind abgerundet und zeigen unregelmäßig angeordnete grobschollige Einlagerungen des Tracers. Am dritten Expositionstag zeigen sich nur wenige Zellen mit überwiegend vermindertem Volumen ohne erkennbare Inkorporation des Tracers.

### 3.8 Zeitverlauf des Tritiumthymidineinbaus in die Mesotheliomzellen

Tab. 3. Zeitverlauf des Tritiumthymidineinbaus in Mesotheliomzellen(ZK 684)

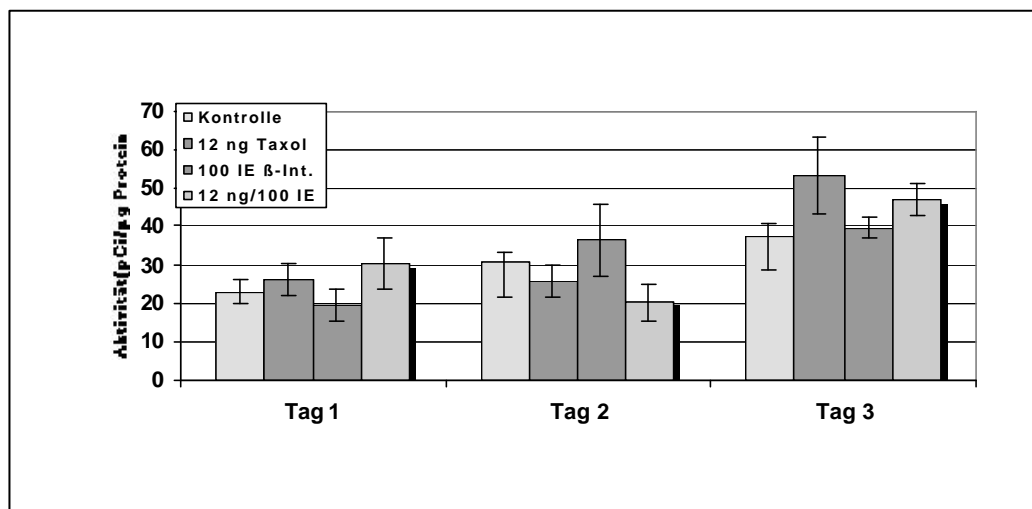
Tritiumthymidineinbau(pCi/μg Protein)						
	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
Behandlung	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	23,07	3,00	30,61	9,22	37,82	8,92
12 ng Taxol	26,27	4,27	25,58	4,38	53,11	9,97
100 IE β-Int.	19,26	4,11	36,66	9,37	39,68	2,80
12 ng/100 IE	30,23	6,97	20,22	4,82	46,94	4,31

MW=Mittelwert

SD=Standardabweichung

Abb. 34

Zeitverlauf des Tritiumthymidineinbaus in Mesotheliomzellen (ZK 684)



Die Tritiumthymidininkorporation nimmt innerhalb der drei Beobachtungstage kontinuierlich zu (Verdoppelung der proteinbezogenen Inkorporation). Signifikante Unterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Zellen ergeben sich jedoch nicht(s. auch Tab. 10-12 auf S. 82-84).



### 3.9 Zeitverlauf des Tritiumthymidinmonophosphateinbaus in Mesotheliomzellen (ZK 684)

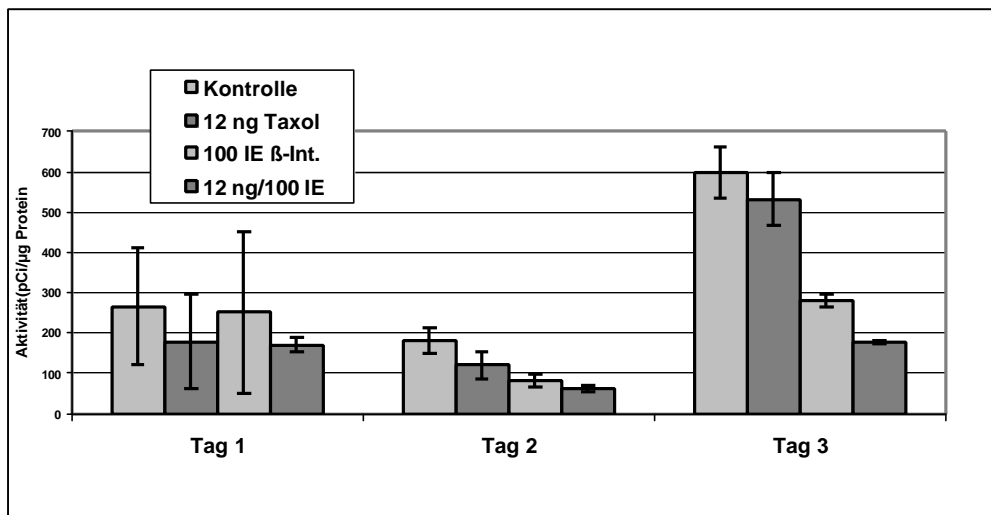
Tab 4 Zeitverlauf des proteinbezogenen Tritiumthymidinmonophosphateinbaus in unbehandelte sowie Interferon-und Taxol-behandelte Mesotheliomzellen(ZK 684)

	Tritium-Thymidin-Monophosphat-Einbau (pCi/ $\mu$ g Protein)					
	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
Behandlung	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	266,11	145,08	181,08	31,85	598,26	65,93
12 ng Taxol	178,2	116,00	121,02	34,00	531,77	65,92
100 IE $\beta$ -Int.	252,07	200,49	83,74	15,52	280,99	12,93
12 ng/100 IE	169,02	18,55	62,36	6,56	177,18	4,39

MW=Mittelwert

SD=Standardabweichung

Abb.35 Zeitverlauf des proteinbezogenen Thymidinmonophosphateinbaus in Mesotheliomzellen(ZK 684)



Der Tritiumthymidinmonophosphateinbau zeigt am ersten Behandlungstag keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Zellen.

Der Einbau unterliegt an den ersten beiden Behandlungstagen starken Schwankungen. Ab dem zweiten Behandlungstag zeigen Interferon und Kombinationen aus Interferon und Taxol signifikante Effekte. Am dritten Behandlungstag steigt der Einbau in die nicht behandelten Zellen sprunghaft an. Der Einbau in die kombiniert behandelten Zellen bleibt hinter den Kontrollgruppen zurück (30% bezogen auf die Kontrollgruppe). Interferon alleine führt zu einem Rückgang der Tritiumthymidininkorporation auf 46% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Taxol alleine zeigt keinen signifikanten Effekt(s. auch Tab 13-15 auf S. 85-87 im Anhang).

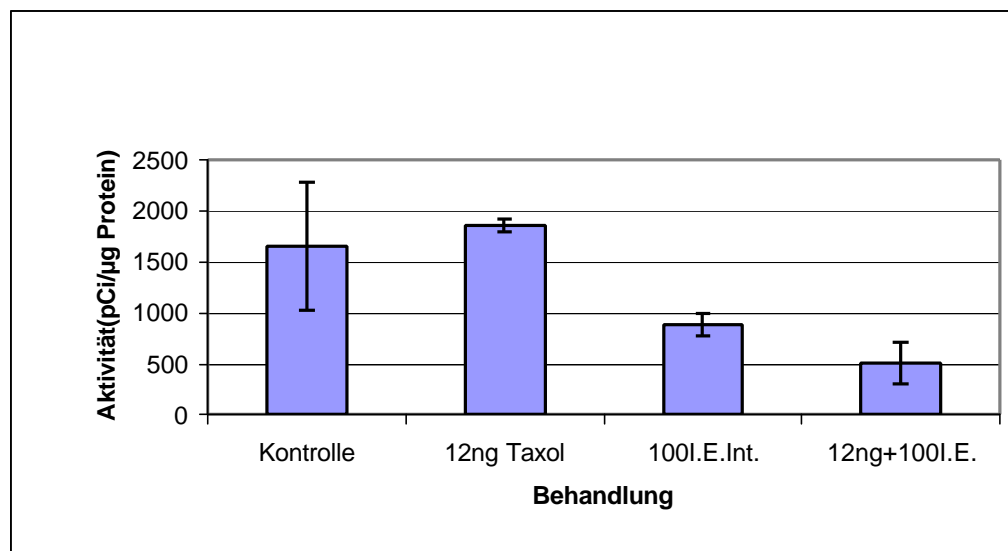
### 3.10 Einfluß von Interferon und Taxol auf die Tritiumthymidininkorporation bei Ovarialcarcinomzellen(sp3)

Die Tabelle 5 und die Abbildung 36 zeigen die Tritiumthymidininkorporation in Ovarialcarcinomzellen der Linie sp3 ohne Behandlung bzw. unter Interferon- und Taxolzugabe sowie Kombinationen. Taxol zeigt alleine signifikanten keinen Effekt, während Interferon alleine die Inkorporation des Tracers um 47% reduziert. Kombinationen reduzieren die Inkorporation auf 30% (s. auch Tab 16 auf S.88 im Anhang).

**Tab.5 Effekt von Interferon und Taxol auf die Tritiumthymidininkorporation bei sp3-Ovarialcarcinomzellen**

	Aktivität Protein (pCi/µg)	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1662,18	627,83
12ng Taxol	1859,02	70,61
100I.E.Int.	888,22	106,45
12ng+100I.E.	504,03	203,24

**Abb.36 Effekt von Interferon und Taxol auf die Tritiumthymidininkorporation bei sp3-Ovarialcarcinomzellen**

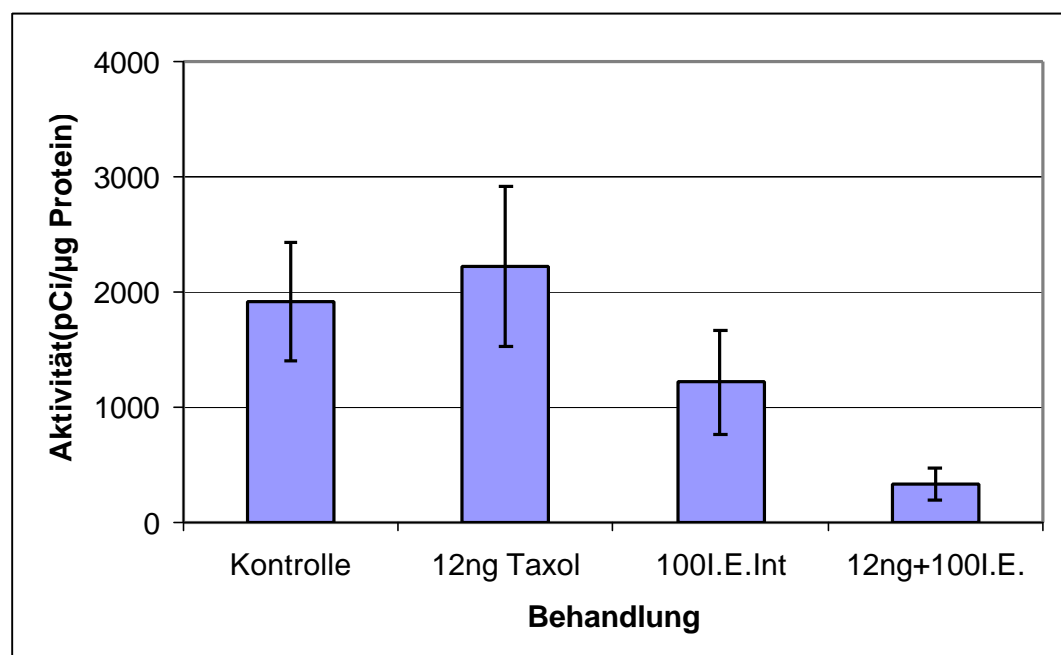


### 3.11 Einfluß von Interferon und Taxol auf die Tritiumthymidinmonophosphatinkorporation bei Ovarialcarcinomzellen(sp3)

**Tab 6 Effekt von Interferon und Taxol auf die Tritiumthymidinmonophosphatinkorporation bei sp3-Ovarialcarcinomzellen**

Behandlung	Aktivität Protein (pCi/µg)	
	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1911,45	511,31
12ng Taxol	2211,19	691,88
100I.E.Int	1209,35	453,9
12ng+100I.E.	326,71	141,75

**Abb. 37 Effekt von Interferon und Taxol auf Tritiumthymidinmonophosphatinkorporation bei sp3-Ovarialcarcinomzellen**



Die Tabelle 6 und die Abbildung 37 zeigen den Einfluß Interferon und Taxol auf die Inkorporation von Thymidinmonophosphat der Ovarialcarcinomlinie sp3(s. auch Tab 17 auf S. 89 im Anhang). Taxol alleine zeigt keinen signifikanten Effekt, Interferon alleine reduziert die Tritiumthymidinmonophosphatinkorporation auf 63% der Kontrollgruppe, Kombinationen hingegen auf 17%. Dies entspricht den mit Tritiumthymidin gefundenen Effekten. Die für Interferon und Kombinationen aus Interferon und Taxol gefundenen Reduktionen der Tritiumthymidin-bzw. Tritiumthymidinmonophosphatinkorporation sind signifikant.

### 3.12 Zusammenschau der Ergebnisse

In der Tabelle 7 sind die untersuchten Zelllinien hinsichtlich Koloniebildung, Kernmarkierung mit Tritiumthymidin und Tritiumthymidinmonophosphat sowie der Inkorporation der extrahierbaren Aktivität vergleichend dargestellt. Ferner ist die Bedeutung des Zeitfaktors für das Zustandekommen von Koloniebildung, Kernmarkierungen und Inkorporation von Aktivität durch die Angabe der jeweiligen Untersuchungstage nach der Aussaat der Zellen hervorgehoben.

**Tab. 7 Zusammenschau der Ergebnisse**

	Untersuchungs-	Zelltypen		
	tage	Mesothelien, benigne	Mesothelien, maligne	Ovarial-ca
Koloniebildung	5	+	+	+
	5	(+)	(+)	+
	5			
<sup>3</sup> H-Thymidin-	1		Cytoplasma	
Markierung	2		Cytoplasma	
	3	Kerne	Cytoplasma	+++ Kerne
<sup>3</sup> H-Thymidin-	1		(+)	+++
Inkorporation	2		(+)	
	3		(+)	
<sup>3</sup> H-Thymidin-	1	+		
Monophosphat-	2			
Markierung	3	+++ (Kerne und Cytoplasma)	+ Kerne	
<sup>3</sup> H-Thymidin-	1		+	+++
Monophosphat-	2		+	
Inkorporation	3		+++	

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 Vergleich der Koloniebildungsmethode mit der Tritiumthymidininkorporationsmethode**

Beim Vergleich der Ergebnisse aus der Koloniebildungsmethode mit den Ergebnissen der Tritiumthymidininkorporationsmethode fällt zunächst die massive Diskrepanz zwischen den in der Koloniebildungsmethode gezeigten antiproliferativen Effekten sowohl für Interferon wie für Taxol und Kombinationen aus beiden Substanzen und dem geringen Rückgang der Tritiumthymidininkorporation auf. Die Hypoxie hat offenbar keinen Einfluß. Diese Ergebnisse legen einen veränderten Thymidinstoffwechsel der Mesotheliomzellen nahe.

### **4.2 Autoradiografien**

#### **4.2.1. Inkorporation von Thymidin und Thymidinmonophosphat in nicht behandelte Zellen**

#### **4.2.1.1 Unterschiedliches intrazelluläres Verteilungsverhalten der beiden Tracer**

Bei der Beurteilung der Autoradiografien nicht behandelter Zellen fällt zunächst die nahezu fehlende Kernmarkierung der untersuchten Mesotheliomzellen durch  $^3\text{H}$ -Thymidin, nicht jedoch durch  $^3\text{H}$ -Thymidinmonophosphat auf. Im Gegensatz hierzu stehen die Zelllinien sp3 sowie benigne Mesothelien, die nach Zugabe beider Tracer eine deutliche Kernmarkierung zeigen. Ferner ist eine deutliche Schwärzung im Bereich der Zellmembran und des Cytoplasmas bei Mesotheliomzellen und benignen Mesothelien nach Zugabe von  $^3\text{H}$ -Thymidinmonophosphat auffällig. Diese ist in geringerem Ausmaß auch nach Zugabe von  $^3\text{H}$ -Thymidin bei Mesotheliomzellen, nicht jedoch bei sp3 zu beobachten. Eine fehlende Kerndarstellung nach Zugabe von  $^3\text{H}$ -Thymidin gilt als Ausdruck fehlender Zellproliferation(18;19;20);  $^3\text{H}$ -Thymidin wird als spezifischer Vorläufer ausschließlich der DNA angesehen, der in der S-Phase des Zellzyklus eingebaut wird(23;24;25). Eine selektive Darstellung der S-Phase wird angenommen. Die  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporation gilt somit als Maß für die DNA-Synthese während des Zellzyklus und damit für die Zellproliferation. Eine fehlende Zellproliferation als Ursache der beobachteten Phänomene ist im vorliegenden Fall jedoch auszuschließen, da die im gleichen Ansatz mit  $^3\text{H}$ -Thymidinmonophosphat parallel untersuchten Zellen eine im Verlauf von drei Tagen zunehmende Kernmarkierung aufweisen. Außerdem steigt die Zelldichte in den Kulturschalen innerhalb von drei Tagen deutlich an. Geht man jedoch von einer fehlenden



Kernmarkierung proliferierender Zellen durch  $^3\text{H}$ -Thymidin aus, so ist die Ursache dafür in der Thymidinaufnahme und Verstoffwechselung und somit im Transportsystem und der Enzymausstattung der Mesotheliomzelle zu sehen.

#### **4.2.1.2 Transport und Verstoffwechselung von Thymidin und Thymidinmonophosphat**

$^3\text{H}$ -Thymidin gelangt über erleichterte Diffusion,  $^3\text{H}$ -Thymidinmonophosphat als geladenes Teilchen über einen aktiven Transport in die Zelle(23). Zwischen dem Thymidin im Extrazellulärraum und dem im Intrazellulärraum gelösten Thymidin stellt sich innerhalb Sekunden ein Gleichgewicht ein. Die Gesamtmenge des im Intrazellulärraum gelösten Thymidins ist niedrig. Das intrazelluläre Thymidin wird während der DNA-Synthese rasch erneuert(23). Eine Interkonversion in andere Nukleotide findet nicht statt (23;24). Das aufgenommene Thymidin wird zunächst im Cytoplasma durch die Thymidinkinase zu Thymidinmonophosphat phosphoryliert. Die Thymidinkinase(TK) kommt in zwei unterschiedlichen Isoenzymen (TK1 und TK2) im Cytosol und in den Mitochondrien(5;12;17;38;45;56) vor. Die Aktivität der mitochondrialen Thymidinkinase beträgt 1-2% der Aktivität der cytosolischen Thymidinkinase. Ein Fehlen der Thymidinkinase wurde in Eukaryonten bisher kaum beschrieben. Hierbei handelt es sich meist um Mutanten innerhalb etablierter Zelllinien im Rahmen der genetischen Instabilität(3;20;41,60). Beziehungen zu anderen Stoffwechselwegen, z.B.der Galaktokinase(87) bzw Sensibilitäten gegenüber Interferon(30) wurden untersucht; regelmäßige Zusammenhänge sind jedoch nicht

nachgewiesen(3;23;39;54;74). Die Empfindlichkeiten gegenüber Zytostatika(alkylierende Substanzen, Inhibitoren der Thymidylatsynthetase) sind vom intrazellulären TTP(Thymidintriphosphat)-Pool abhängig(95) und korrelieren nicht zwangsläufig mit dem Fehlen der Thymidinkinase. Die cytosolische Thymidinkinase(63) ist im Gegensatz zur mitochondrialen Thymidinkinase zellzyklusabhängig; die Transkription wird Cyclin2abhängig reguliert. Die cytosolische Thymidinkinase(TK1) gilt als Proliferationsmarker; die intrazelluläre Aktivität fehlt in ruhenden Zellen fast völlig, bei Eintritt in den Zellzyklus erfolgt eine verstärkte Transkription. In einer Vielzahl von Tumorzellen wurde eine erhöhte Aktivität der Thymidinkinase im Vergleich zum benignen Phänotyp beschrieben(53;55;69;78). Hierbei besteht keine Regulation innerhalb des Zellzyklus; die Thymidinkinase ist zumeist während aller Phasen des Zellzyklus erhöht. Ferner kann die Thymidinkinase in ihrer Aktivität durch eine reversible Phosphorylierung- und Dephosphorylierung inaktiviert bzw. reaktiviert werden(56). Dies erfolgt ebenfalls zellzyklusabhängig; bei Eintritt in die M-Phase erfolgt die Phosphorylierung am Serinrest13; in der G2- und der S-Phase liegt die Thymidinkinase in der dephosphorylierten Form vor(12;13;63). Die Substrataffinität der Thymidinkinase unterliegt ebenfalls einer Regulation: Thymidintriphosphat inhibiert den weiteren Umsatz von Thymidin zu Thymidinmonophosphat. Ferner ist die intrazelluläre ATP-Konzentration entscheidend(63); bei hoher ATP-Konzentration bilden sich aus einer dimeren Form der Thymidinkinase Tetramere mit einer sehr viel höheren Substraffinität.( $K_m$ -Werte14  $\mu\text{M}$  bzw. 0,5 $\mu\text{M}$ ). Die weitere Phosphorylierung des Thymidinmonophosphat erfolgt über die Thymidinmonophosphatkinase zum Thymidindiphosphat und die Thymidindiphosphatkinase zum Thymidintriphosphat, das in die DNA eingebaut wird. Neben dem Einbau exogenen Thymidins ist die Zelle

jedoch zur Eigensynthese des Thymidins befähigt. Diese erfolgt aus Uridinmonophosphat zu Thymidinmonophosphat und wird von der Thymidylatsynthetase katalysiert. Die Methylierung von Uracil zu Thymin erfordert Tetrahydrofolat.(23;24;25) Folglich kann das zur Zellproliferation benötigte Thymidin-Monophosphat unter Umgehung der Thymidinkinase über die Eigensynthese bereitgestellt werden. Die Phosphorylierung exogenen Thymidins kann auch als salvage pathway angesehen werden. Da der Einbau des  $^3\text{H}$ -Thymidin, nicht jedoch des  $^3\text{H}$ -Thymidinmonophosphat blockiert ist, ist die Thymidinkinase auf zellulärer Ebene offenbar nicht aktiv, d.h. die Aktivität innerhalb der Mesotheliomzelle fehlt oder ist stark vermindert. Dies könnte einerseits durch ein defektes oder blockiertes Thymidinkinase-Gen oder über eine Hemmung durch Thymidintriphosphat zustandekommen. Eine extrahierbare erhöhte Thymidinkinasekonzentration aus Tumorbiopsien wurde beschrieben; allerdings war dies im wesentlichen bei sarkomatösen Mesotheliomen(28) deutlich: Untersuchungen auf zellulärer Ebene liegen nicht vor. Damit fehlt die Abgrenzung der erhöhten Thymidinkinase in den neoplastischen von den reaktiven Zellelementen innerhalb des Tumors. Eine Aussage über die Aktivität bzw. möglichen Substratumsatz der extrahierten Thymidinkinase wurde ebenfalls nicht getroffen. Eine Beschleunigung des Tumorwachstums und im Vergleich zum ursprünglichen Tumor erheblich gesteigerte Aktivität der Thymidinkinase wurde jedoch an Xenotransplantaten an der Nacktmaus beschrieben(37). Ein Gendefekt ist somit weniger wahrscheinlich; die Bevorzugung der Eigensynthese seitens der Mesotheliomzelle mit konsekutiver Blockierung der Thymidinkinase ist wahrscheinlicher. Eine Bevorzugung der Thymidineigensynthese gegenüber dem salvage pathway wurde an proliferierenden Keratinozyten beschrieben; die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme korrelierte daher nicht mit der

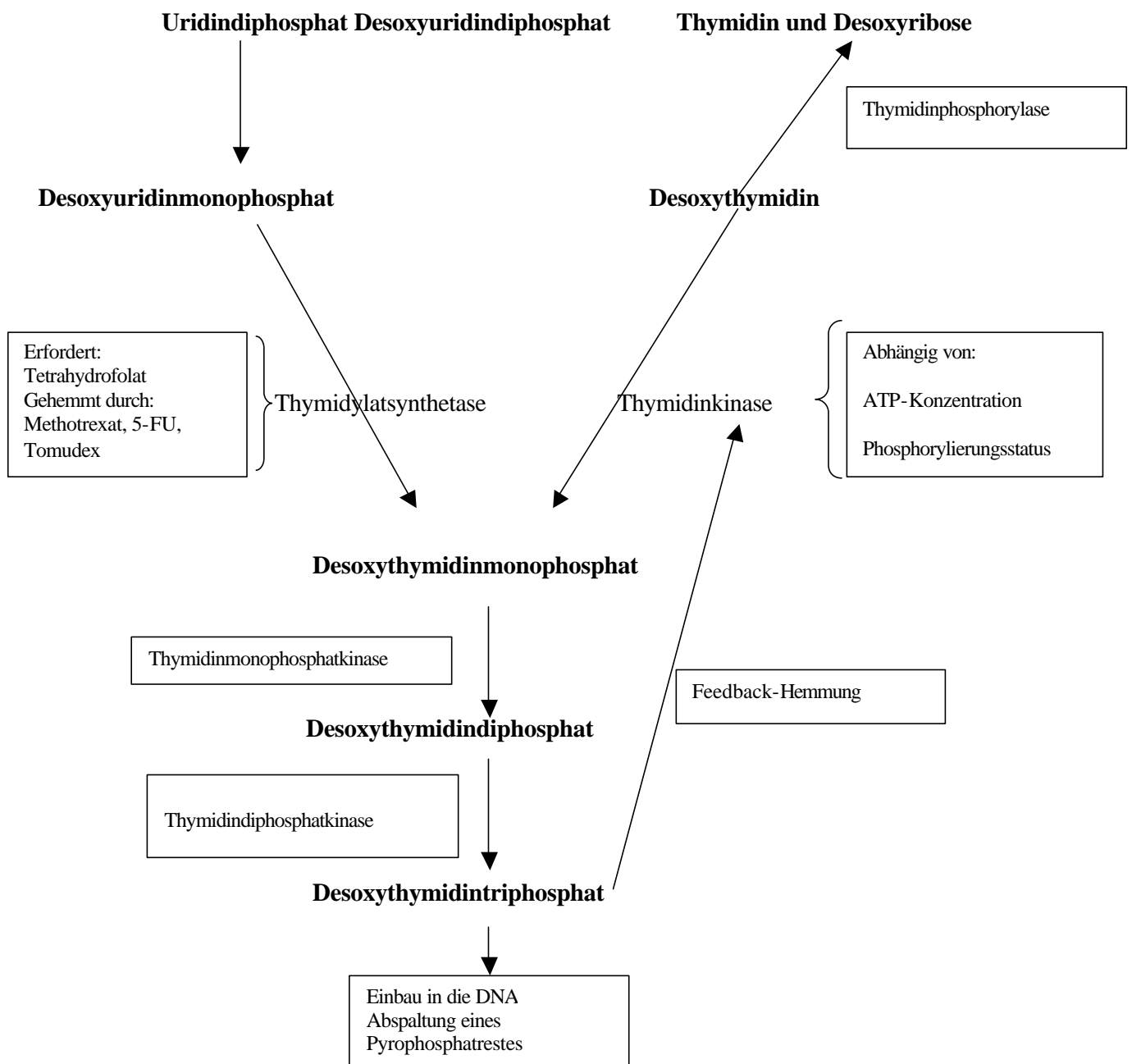
Zellproliferation(16). An Leukämiezellen der akuten Monozytenleukämie wurde eine geringe Erhöhung der Thymidinkinase<sup>1</sup>, hingegen eine starke Erhöhung der Aktivität der Thymidinphosphorylase beschrieben(92). Eine Hemmung durch Thymidintriphosphat ist im Rahmen einer Genamplifikation der Thymidylatsynthetase denkbar. Neben dem Einbau in die DNA ist jedoch auch eine Spaltung des aufgenommenen Thymidins und Thymidinmonophosphats möglich. Die Thymidinphosphorylase spaltet Thymidin in Thymin und Desoxyribose. Diese kann u.a. auch auf Purinbasen übertragen werden.(23;24;25). Das überschüssige Thymin kann aus der Zelle aktiv sezerniert werden. Hierdurch läßt sich möglicherweise ein Konzentrationsgradient –autoradiografisch eine umschriebene Schwärzung im Bereich der Zellmembran- erklären. Thymidinmonophosphat ist eine energiereiche Substanz, deren Dephosphorylierung der Zelle die Bereitstellung energiereicher Phosphate ermöglicht. Die Dephosphorylierung des Thymidinmonophosphats wird von der alkalischen Phosphatase katalysiert; dieser wird eine pH-Wert-abhängige Regulation der DNA-Synthese zugeschrieben(23). Die Spaltung des Thymidins und des Thymidinmonophosphats findet im Cytoplasma statt. Die Markierung des Cytoplasmas- allerdings in wesentlich geringerem Umfang als der Zellkerne- wurde unter Bestrahlung an Pflanzenzellen beschrieben und mit einem Katabolismus aufgenommenen Thymidins in Verbindung gebracht(23;24;31). Die Schwärzung des Cytoplasmas in den Autoradiografien läßt sich möglicherweise über einen dort stattfindenden Thymidinabbau erklären. Die aktive Aufnahme nicht für die DNA-Synthese benötigten Thymidinmonophosphats dient vermutlich der Energiegewinnung. Die Aufnahme des Thymidinmonophosphats ins Cytoplasma ist besonders ausgeprägt in benignen Mesothelien und Mesotheliomzellen, fehlt jedoch in sp3. Benigne Mesothelien vermehren sich im Vergleich zu Mesotheliomzellen

deutlich langsamer, was eine geringere DNA-Synthese nach sich zieht; in Mesotheliomzellen ist vermutlich die Eigensynthese von Thymidinmonophosphat aufgrund von Genamplifikationen der Thymidylatsynthetase erhöht. Ein Abbau überschüssig vorhandenen Thymidinmonophosphats ließe sich in diesem Rahmen erklären. Eine Übersicht über den Thymidinstoffwechsel liefert die Abbildung 38.

**Abb. 38 Der Thymidinstoffwechsel**

**De novo-Synthese**

**salvage-Metabolismus**





## **4.2. Inkorporation von Thymidin und Thymidinmonophosphat in behandelte Zellen**

### **4.2.2.1 Behandlung mit Interferon**

Zunächst fällt wiederum die fehlende Kerndarstellung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin an den Mesotheliomzellen auf. Die Kerndarstellung mit  $^3\text{H}$ -Thymidinmonophosphat nimmt innerhalb von drei Tagen kontinuierlich ab und verschwindet nahezu vollständig. Eine morphologische Veränderung der Zellen zeigt sich nicht. Ferner fällt die zunehmende Schwärzung der Zellmembran und des Zytoplasmas an den beiden ersten Expositionstagen auf. Am dritten Expositionstag verschwindet diese wiederum. Interferon bindet zunächst an einen Rezeptor an der Zelloberfläche und führt über Proteine zu einer Signaltransduktion(15) zum Zellkern und verändert zahlreiche Genaktivitäten. Interferon modifiziert die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren und modifiziert damit die Zellproliferation. Auch eine Induktion der Thymidinphosphorylase in Colonicarcinomen(80;82) und Nierenzellcarcinomen(52) wurde beschrieben. Dies wird in Therapieprotokollen zur Behandlung kolorektaler Carcinome bzw. zur Behandlung von Nierenzellcarcinomen genutzt. Das Zytostatikum 5-Fluorouracil wird über die Thymidinphosphorylase aktiviert, die Kombination mit Interferon soll die Wirksamkeit des Zytostatikums über die Enzyminduktion und damit über die verstärkte Aktivierung im Tumor erhöhen. Die verminderte Kerndarstellung ist über die verminderte mitotische Aktivität, die

vermehrte Markierung des Cytoplasmas über einen vermehrten Katabolismus des Thymidins erklärlich.

#### **4.2.2.2 Behandlung mit Taxol sowie Kombinationen aus Interferon und Taxol**

Bei den Taxol-behandelten Zellen zeigt sich neben der fehlenden Kerndarstellung auch unter  $^3\text{H}$ -Thymidinmonophosphat ebenfalls eine starke Schwärzung des Cytoplasmas; dasselbe gilt für Kombinationen aus Interferon und Taxol. Für beide Substanzen wurde eine Induktion der Thymidinphosphorylase beschrieben. Diese ist überwiegend im Cytoplasma lokalisiert und spaltet Thymidin in Thymin und Desoxyribose. Auch ein durch Interferon induzierter Mangel an energiereichen Phosphaten und damit ein verstärkter aktiver Transport in die Zelle sind denkbar. Dies setzt jedoch die Vitalität der Zellen voraus. Nach drei Tagen ist dies nicht mehr zu beobachten; es findet nahezu keine Markierung mehr statt. Die wenigen überlebenden Zellen zeigen starke morphologische Veränderungen. Die Zellen sind abgerundet; das Zellvolumen ist stark vermehrt oder vermindert, was für das gleichzeitige Vorliegen von Nekrosen und Apoptosen spricht. Auf zellulärer Ebene wurde für Taxol eine Blockierung des Übergangs von der Metaphase zur Anaphase im Zellzyklus und die Induktion der Apoptose beschrieben. Taxol bindet an Mikrotubuli und verhindert dadurch deren Depolymerisation. Das antiapoptotische Membranprotein bcl2 wird phosphoryliert und damit inaktiviert.(11;33;34;44) Ferner wurde eine vermehrte Apoptoserate durch vermehrte Bindung des CD95-

Liganden(79) beschrieben. Eine zusätzliche DNA-Synthese findet hingegen nicht statt, obgleich die Zellen zum Teil mehrere Kerne aufweisen.

#### **4.3.1 Beurteilung des Zeitverlaufs der Tritium-Thymidin und Tritium-Thymidinmonophosphatinkorporation**

Zunächst fällt bei der Mesotheliomlinie ZK 684 am ersten Expositionstag sowohl für Tritiumthymidin wie auch Tritiumthymidinmonophosphat kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Zellen auf. Allerdings ist die inkorporierte Aktivität bei Tritium-Thymidinmonophosphat deutlich höher als bei Tritiumthymidin. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Autoradiografien, die am ersten Expositionstag noch keine Kernmarkierung erkennen lassen. Am zweiten Expositionstag fällt die Inkorporation des Tritiumthymidinmonophosphat , nicht jedoch diejenige des Tritiumthymidin auf 30% der Kontrollgruppen ab. Die Gesamtinkorporation fällt lediglich bei kombinierter Behandlung mit Interferon und Taxol um ca. 30% ab. Auch diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Autoradiografien: Am zweiten Expositionstag wird mit Tritiumthymidinmonophosphat, nicht jedoch mit Tritiumthymidin eine Kerndarstellung erzielt, die nach Behandlung mit Interferon und/oder Taxol jedoch nicht beobachtet wird. Die dennoch gemessene extrahierte Aktivität ist wahrscheinlich durch die Inkorporation ins Cytoplasma bedingt. Zu diesem Zeitpunkt sind in den Autoradiografien an den behandelten Zellen morphologische Veränderungen erkennbar. Allerdings ist hier die fehlende Tritiumthymidininkorporation am ersten Expositionstag in den Autoradiografien

und damit korrelierend die niedrige Tritiumthymidininkorporation am ersten Expositionstag auffällig. Ferner finden sich bereits am zweiten Expositionstag morphologische Veränderungen der Zellen und damit korrelierend ein geringerer Abfall der Inkorporation von Tritiumthymidinmonophosphat am zweiten Tag. Die Tritiumthymidininkorporationsmethode basiert im wesentlichen auf der Annahme, daß das intrazelluläre, extrahierbare Thymidin während der S-Phase in die Zellkerne eingebaut wird und damit ein Maß für die DNA-Synthese darstellt. Dies setzt jedoch die weitere Phosphorylierung des Thymidin voraus. Bei fehlender bzw. inaktiver Thymidinkinase ist lediglich der mit Tritiumthymidinmonophosphat durchgeführte Assay aussagekräftig. Ferner läßt diese Methode nur bedingt Rückschlüsse auf die intrazelluläre Verteilung des Tracers zu; der im Cytoplasma gelöste Anteil des in die Zellen aufgenommenen Thymidins stellt die säurelösliche Fraktion dar und wird überwiegend durch die Zugabe von Trichloressigsäure extrahiert und verworfen, wobei die Vollständigkeit der Abtrennung jedoch ungeklärt ist. Artefakte sind insbesondere bei Pharmaka, welche auch den Katabolismus des Tritiumthymidin/Tritiumthymidinmonophosphat beeinflussen, zu erwarten (Interferon bzw. Taxol). Bei den Ovarialcarcinomzellen zeigt sich eine deutliche Sensibilität gegenüber Interferon bzw. Kombinationen aus Interferon und Taxol, die sich in der Inkorporation von Tritiumthymidin und Tritiumthymidinmonophosphat gleichermaßen niederschlägt

#### **4.3.2 Aussagefähigkeit beider Methoden**

Die Autoradiografien geben Aufschlüsse über die intrazelluläre Verteilung des Tracers. Eine Quantifizierung der Thymidininkorporation in den einzelnen

Zellkompartimenten(Zellkern bzw. Cytoplasma ) ist mit dieser Methode jedoch ebenfalls nicht möglich. Die Blockierung der Tritiumthymidininkorporation in die Zellkerne im Gegensatz zur Inkorporation des Tritiumthymidinmonophosphat und damit die fehlende Funktion der Thymidinkinase auf zellulärer Ebene läßt sich darstellen. Rückschlüsse über deren Zustandekommen, z.B. Gendefekt, Blockierung der Transkription oder Hemmung des Enzyms durch Substanzen im Cytoplasma(Feedback durch Tritiumthymidintriphosphat) bzw. verminderte Substraffinität, hervorgerufen durch ATP-Mangel, sind jedoch nicht möglich.

Eine Klärung dieses Mechanismus der Inaktivierung der Thymidinkinase auf zellulärer Ebene könnte folgendermaßen erfolgen:

Sollte sich aus den kultivierten Mesotheliomzellen aktive Thymidinkinase extrahieren lassen, scheidet eine Blockierung auf genetischer Ebene als Ursache aus. Enthalten die Mesotheliomzellen jedoch keine extrahierbare Thymidinkinase, so stellt sich die Frage, ob das Thymidinkinase-Gen selbst fehlt oder die Transkription blockiert ist oder eine posttranslationale Modifikation vorliegt. Dies wäre im einzelnen nur mit molekularbiologischen Methoden, z. B. Genomanalysen zu klären. Eine Substrathemmung durch im Überschuß vorhandenes Tritiumthymidintriphosphat ließe sich durch eine Blockierung der Thymidylatsynthetase überwinden. Sollte sich aus den Mesotheliomzellen eine Thymidinkinase extrahieren lassen, wären an der extrahierten und gereinigten Thymidinkinase enzymkinetische Untersuchungen zur Bestimmung des Km-Wertes sowie ATP-Abhängigkeit und Substrathemmung durch Thymidintriphosphat denkbar.

## **5. Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten benigner und maligner Mesothelzellen sowie vergleichsweise auch von Ovarialcarcinomzellen bei der Koloniebildungsmethode, der Autoradiographie und der Tritiumthymidininkorporation mit und ohne Taxol und Interferon systematisch zu untersuchen und besonders im Hinblick auf den Thymidinstoffwechsel zu interpretieren.

Mesotheliomzellen reagieren in der Koloniebildungsmethode sensibel auf Interferon und Taxol sowie in besonderem Maße auf Kombinationen aus beiden Substanzen. Dies kann anhand der Thymidininkorporationsmethode nicht nachvollzogen werden. Die Autoradiografien zeigten eine Inkorporation des Tritiumthymidins ausschließlich in Cytoplasma der Mesotheliomzellen, während die Zellkerne völlig ausgespart waren. Im Gegensatz hierzu steht Tritiumthymidinmonophosphat, das sowohl in die Zellkerne wie auch ins Cytoplasma inkorporiert wird. Die Autoradiografien liefern zusätzliche Erkenntnisse über die jeweiligen Mechanismen der Zellschädigung; bei Interferon steht offensichtlich die Proliferationshemmung im Vordergrund, während eine morphologisch erkennbare Schädigung der Zellen nicht stattfindet. Bei Taxol wurden in wechselndem Ausmaß Nekrosen und möglicherweise auch Apoptosen induziert, was sich in der veränderten Zellgröße und-form niederschlägt. Eine Quantifizierung der im einzelnen beteiligten Phänomene erfordert die Untersuchung in einem Spezialassay und muß zunächst offenbleiben.

Wird die Tritiumthymidininkorporationsmethode mit phosphoryliertem Thymidin als



Tracer durchgeführt, zeigt diese eine im Vergleich zur Kontrollgruppe um 40-80% rückläufige Inkorporation.

Im Gegensatz zur den Mesotheliomzellen stehen benigne Mesothelien und Ovarialcarcinomzellen(sp3). Beide Zellreihen nehmen  $^3\text{H}$ -Thymidin in die Zellkerne auf. Im Bezug auf die Inkorporation des Tritiumthymidinmonophosphat unterscheiden sich benigne und maligne Mesothelzellen nicht

Die Ergebnisse lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

In Mesotheliomzellen ist die Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Thymidin zu  $^3\text{H}$ -Thymidinmonophosphat blockiert. Dies spricht für eine stark verminderte Aktivität der Thymidinkinase. Als Ursache kommen in Betracht:

- Ein fehlendes oder defektes Gen der Thymidinkinase
- Eine gestörte Regulation der Genaktivität
- Eine Inaktivierung der Thymidinkinase durch Phosphorylierung
- Substratmangel- induziert durch die – möglicherweise erhöhte – Thymidinphosphorylase

- Eine Substrathemmung durch im Überschuß vorhandenes Thymidintriphosphat

Die Bereitstellung des zur DNA-Synthese benötigten Thymidintriphosphats über die Eigensynthese ist anzunehmen; eine Genamplifikation der Thymidylatsynthetase daher wahrscheinlich.

Eine Beeinflussung des Katabolismus von Thymidin und Thymidinmonophosphat durch Interferon und Taxol ist ebenfalls anzunehmen.

Die  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporationsmethode ist beim malignen Mesotheliom kein adäquater Proliferationsassay; lediglich bei Verwendung bereits phosphorylierten Thymidins als Tracer lassen die Meßwerte Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der Mesotheliomzelle zu.

## **Ausblick**

Der Thymidinstoffwechsel der Mesotheliomzelle läßt eine geringe Sensibilität gegenüber Zytostatika erwarten, die über die Thymidinkinase aktiviert werden. Eine Kombination von Zytostatika, die über die Thymidinphosphorylase aktiviert werden, mit Interferon erscheint jedoch wegen der wahrscheinlichen Enzyminduktion denkbar. Ein Fehlen oder eine verminderte Aktivität der Thymidinkinase bedingt für die betroffene Tumorzelle die Notwendigkeit, den Thymidinbedarf ausschließlich über die Eigensynthese zu decken, da exogen zugeführtes Thymidin nicht oder nur verzögert phosphoryliert und damit in die DNA eingebaut werden kann. Eine Hemmung der Thymidylatsynthetase eröffnet bei fehlender Thymidinkinase in den Mesotheliomzellen die Möglichkeit, die Mesotheliomzellen selektiv in einen thymidinlosen Zustand zu versetzen. Eine Kompensationsmöglichkeit durch exogen zugeführtes Thymidin besteht nur, falls die Mesotheliomzellen den salvage pathway der Thymidinutilisation reaktivieren können. Dabei spielt der Mechanismus der Thymidinkinaseinaktivierung eine entscheidende Rolle; eine genetische Inaktivierung läßt sich kaum überwinden. Eine Hemmung durch Thymidintriphosphat ist bei Fehlen der Thymidylatsynthetase nicht mehr zu erwarten. Ferner spielt der ATP-Gehalt der Mesotheliomzelle hierbei eine entscheidende Rolle. Inhibitoren der Thymidylatsynthetase sind z.B. 5-Fluorouracil und Methotrexat. Ein neuer hochspezifischer Inhibitor der Thymidylatsynthetase ist Tomudex(2), das sich derzeit in klinischer Erprobung zur Therapie kolorektaler Carcinome befindet. Resistenzentwicklungen sind u. a. durch Genamplifikationen der Thymidylatsynthetase beschrieben. Im klinischen Einsatz wäre ein Hochdosisprotokoll unter Einschluß eines Thymidin-Rescue, d. h. eine exogene

Thymidinzufuhr denkbar. Exogenes Thymidin käme gesundem Gewebe, z. B. das Knochenmark zugute, während Mesotheliome dieses vermutlich nicht phosphorylieren und damit nicht in die DNA einbauen können. Die Wirkung des Tomudex gegen die Mesotheliome wäre daher wahrscheinlich nicht beeinträchtigt, während sich die hämatologische Toxizität durch die Thymidingabe mindern ließe.

## 6. LITERATUR

1. Abonyi M.; Prajda N.; Hata Y., Nakamura H.; Weber G.  
Methotrexate decreases thymidine kinase activity  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 187(1): 522-528 (1992)
2. Armand J.P.; Seymour L.; Evans T.R.J.  
Raltitrexed(Tomudex(TM)) in combination with platinum-based agents and/or  
anthracyclines: Preliminary results of phase I clinical trials  
European Journal of Cancer 35 Suppl.1:14-18 (1999)
3. Balzarini J.; De Clercq E.; Verbruggen A.; Crumpacker C.; Ayusawa D.;  
Seno T.  
Increased sensitivity of thymidine kinase deficient (TK-)  
tumor cell lines(TK-) to the cell growth inhibitory effects  
of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine(BVDU) and  
related compounds  
Anticancer Res. 5: 1077-84 (1986)
4. Blagosklonny M.V.; Schulte Th.; Nguyen P.; Trepel J., Neckers L.  
Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of bcl-2 protein involves c-raf-1  
and represents a novel c-raf signal transduction pathway  
Cancer Research 56: 2851-1854 (1996)

5. Bello L. J.  
Regulation of thymidine kinase synthesis in human cells  
Exp.Cell Res. 89: 263-274 (1971)
6. Bowman R.V.; Manning L.S.; Davis M.R.; Robinson B.W.S.  
Chemosensitivity and cytokine sensitivity of malignant mesothelioma  
Cancer Chemother.Pharmacol. 28(6): 420-6 (1991)
7. Brent T.P.  
Periodicity of DNA synthetic enzymes during the HeLa cell cycle  
Cell Tissue Kinet. 4: 297-305 (1971)
8. Buard A.; Vivo C.; Monnet I.; Boutin C.; Pilatte Y.; Jaurand M.C.  
Human malignant mesothelioma cell growth: activation of janus kinase 2  
and signal transducer and activator of transcription 1alpha for inhibition  
by interferon gamma  
Cancer Res. 58(4): 840-847 (1998)
9. Burger C.; Wick M.; Brusselbach S.; Muller R.  
Differential induction of metabolic genes after mitogen stimulation  
and during normal cell cycle progression  
J.Cell Sci. 107(Pt 1): 241-252 (1994)

10. Burmer G.C.; Rabinovitch P.S.; Kulander B.G.; Rusch V.; McNutt M.A.  
Flow cytometric analysis of malignant pleural mesotheliomas  
Hum. Pathol. 20(8):777-783 (1989)
11. Caplow M.; Zeeberg B.  
Dynamic properties of microtubules at steady state in the presence of taxol  
Eur. J. Biochem. 127:319-324 (1982)
12. Chang Z.F.; Huang D.Y.; Chi L.M.  
Serine 13 is the site of mitotic phosphorylation of human thymidine kinase  
J. Biol. Chem. 273(20): 12095-13000 (1998)
13. Chang ZF.; Huang D.Y.; Hsue N.C.  
Differential phosphorylation of human thymidine kinase in proliferating  
and M-phase arrested human cells  
J. Biol. Chem. 269(33):21249-54 (1994)
14. Collins A.R; Schor S.L; Johnson RT.  
The inhibition of repair in UV-irradiated human cells  
Mutat. Res. 42(3): 413-432. (1977)
15. Darnell J.E.; Kerr Im, Stark G.R.  
Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response  
to interferons and other extracellular signaling proteins  
Science 264:1415-1421 (1994)



16. Davison P.; Liu S.; Karasek M.  
Limitations in the use of <sup>3</sup>Hthymidine incorporation into DNA as an indicator  
of epidermal keratinocyte proliferation in vitro  
Cell Tissue Kinet. 12(69): 605-614 (1979)
17. Denning C.; Pitts J..D.  
Bystander effects of different enzyme prodrug-systems for cancer gene therapy  
depend on different pathways for intracellular transfer of toxic metabolites, a  
factor that will govern clinical choice and regimes  
Hum.Gene Ther. 10 (15): 1825-1835 (1997)
18. De Clercq E.; Beres J.; Bentrude W.G.  
Potent activity of 5-fluoro-deoxyuridine and related compounds  
against thymidine kinase-deficient (TK-) herpes-simplex-virus  
targeted at thymidylate synthase  
Mol.Pharmacol. 32(1): 286-292 (1987)
19. Deuß U.; Allolio B.; Kaulen D.; Winkelmann W; Arnold C. Pack I.  
Serum-Thymidinkinase als Tumormarker beim Bronchialcarcinom:  
Stadienabhängigkeit und Verlaufskontrollen  
TumorDiagnostik/Therapie 8 69-74 (1987)

20. Diviza M.; Baglioni C.  
Lack of correlation between thymidine kinase activity and the antiviral  
or antiproliferatives response to interferon  
Virology 133(1): 216-219 (1984)
21. Ellims P.H.; van der Weyden M.B.; Medley G.  
Thymidine kinase isoenzymes in human malignant lymphoma  
Cancer Res. 41 (2):691-695 (1981)
22. Emri S.; Koc Y.; O'Brien M.C.; Sanders D.; Tansan S.; Foss F.  
Taxol and arginine butyrate exert some effect on human mesothelioma cells  
(Meeting Abstract)Proc-Annu-Meet-Am-SocClinOncol. 13:A316 (1994)
23. Feinendegen L. E.  
Tritium-labeled molecules in biology and medicine  
Academic Press New York and London 1967
24. Feinendegen L.E.; Bond V..P.; Hughes W.L.  
RNA mediation in DNA-synthesis in HeLa cells studied  
with tritium-labeled cytidine and thymidine  
Exptl. Cell Res. 25:627-647 (1961)

25. Feinendegen L.E.; Bond V.P. ; Painter R.B.  
Studies on the interrelationship of RNA-synthesis, DNA-synthesis  
and precursor pool in human tissue culture cells studied  
with triated pyrimidine nucleosides  
Exptl. Cell Res. 22:381-405 (1961)
26. Ficq A.  
Autoradiography , in the Cell  
J Brachet and A.E. Miskey,  
Vol 1: 67-90 Academic Press Inc.; New York 1959
27. Fitzgerald P.J.  
Radioautography, its use in cytology , in Analytical Cytology,  
(R.C. Mellors, ed) 2<sup>nd</sup> ed, McGrawHill Company, New York 1959
28. Fox St. B.; Moghaddam A.; Westwood M, Turley H.; Bicknell R.;  
Gatter K. C.; Harris A.L.  
Platelet-derived endothelial cell growth factor-thymidine phosphorylase  
expression in normal tissues: an immunohistochemical study  
Journal of Pathology 176:183-190 (1995)
29. Frankel A., Buckman R.; Kerbel R.S.  
Abrogation of Taxol-induced G2-M-arrest and apoptosis in human ovarian  
cancer cells grown as multicellular tumor spheroids  
Cancer Research 57: 2388 –2393 (1997)

30. Gewert D.R.; Cohen A.; Williams B.R.  
The effect of interferon on cells deficient in nucleoside transport or lacking thymidine kinase activity  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 118(1): 124-30 (1984)
31. Girgis A.; Vieuchange J.  
Incorporation de thymidine radioactive dans des cellules de mammifères cultivées in vitro  
Ann Inst. Pasteur 106:29-47; (1964)
32. Greengard O.; Head J.F.; Chahinian A.P.; Goldberg S.L.  
Enzyme pathology of human mesothelioma  
J.Natl. Cancer-Inst. 78(3):617-622 (1987)
33. Haldar S.; Jena N.; Croce C..M.  
Inactivation of bcl2 by phosphorylation  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9: 4507-4511 (1995)
34. Haldar S.; Chintapalli J.; Croce C.M.  
Taxol induces bcl2-phosphorylation and death of prostate cancer cells  
Cancer Res. 56: 1253-1255 (1996)

35. Hand A.; Pelin K.; Mattson K.; Linnainmaa K.  
Interferon(IFN)-alpha and IFN-gamma in combination with methotrexate: in vitro sensitivity studies in four human mesothelioma cell lines  
Anti-Cancer Drugs 6: 77-82 (1995)
36. Hanson S.; Ullman B.  
AMP deaminase and thymidine kinase deficiencies in a mutant mouse S49 cell clone  
Adv.Exp.Med.Biol. 253B: 179-86 (1989)
37. Head. J.F.; Chahinian A.P.; Greengard O.  
Enzymic composition and growth rate of human pleural mesothelioma transplants in nude mice  
Cancer-Biochem.Biophys. 12(2):127-136 (1991)
38. He Q.M.; Skog S.; Welander I.; Tribukait B.  
Enzyme kinetics of thymidine kinase isoenzymes of Ehrlich ascites tumour  
Anticancer Res. 10(5A): 1257-1263 (1990)
39. Hoglund L.; Pontis E.; Reichard P.  
Effects of deoxycytidine and thymidine kinase deficiency on substrate cycles between deoxyribonucleosides and their 5'phosphates  
Cancer Res. 48(13):3681-71988 (1988)

40. Horwitz S.B.  
Mechanism of action of taxol  
TIPS 13: 134-136 (1992)
41. Houghton P.J.; Houghton J.A.; Germain G.; Torrance P.M.  
Development and characterization of a human colon adenocarcinoma xenograft  
deficient in thymidine salvage  
Cancer Res. 47: 2117-2219 (1987)
42. Howard W.D.; Timasheff S.N.  
Linkages between the effects of taxol colchicine, and GTP on tubulin  
polymerization  
J. Biol.Chem. 263: 1342-1346 (1998)
43. Jaurand M.C.; Buard A.; Zeng L.; Laurent Ph.; Fleury J.; Kheuang L.  
The mesothelial cell in vitro: contribution to the study of mesothelioma  
Eur. Resp. Rev. 3: 126-131 (1993)
44. Jordan M. A; Wendell K.; Gardiner S.; Derry W. B.; Copp H.; Wilson L.  
Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol)  
results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death  
Cancer Res. 56: 816-825 (1996)



45. Keller P.; Zownir O.; Morrow J.  
Bromodeoxyuridine resistance: thymidine transport and phosphorylation in  
Friend leukemia cells  
Mutat.Res. 126(1): 53-62 (1984)
46. Kim E.C.; Lau J.S.; Rawlings S.; Lee A.S.  
Positive and negative regulation of the thymidine kinase promoter mediated by  
CCAAT binding transcription factors NF-Y/CBF, dbpA, and CDP/cut  
CellGrowthDiffer. 8(12): 1329-38 (1997)
47. Kit S.  
Thymidine kinase, DNA-synthesis and cancer  
Mol.Cell Biochem. 11(3): 161-182 (1976)
48. Kit S. and Leung W.C.  
Submitochondrial localisation and characteristics of thymidine kinase  
molecular forms in parental and kinase deficient HeLa cells  
Biochem.Genet. 11: 231-24 (1974)
49. Koukourakis M.I.; Giattromanolaki A.; Kakolyris S.; O'Byrne K.J.,  
Apostolikas N.; Skarlatos J.; Gatter K.C.; Harris A.L.  
Different patterns of stromal and cancer cell thymidine phosphorylase reactivity  
in non-small cell lung cancer : impact on tumour neoangiogenesis and survival.  
Br.J.Cancer 77(10): 1696-1703 (1998)

50. Kroep J.R.; van Moorsel C.J Veerman G.; Voorn D.A.; Schultz R.M.;  
Worzalla J.F.; TanzerL.R.; Merriman R.L.; Pinedo H.M.; Peters G:J.  
Role of deoxycytidine /dCK), thymidine kinase 2(TK2), and deoxycytidine  
deaminase(dCDA) in the antitumor activity of gemcitabine(dFdC)  
Adv.Exp.Med.Biol. 431:657-660 (1998)
51. Lanni J.S.; Lowe S.W; Licitra E.J.; Liu J.O; Jacks T.  
P53-independent apoptosis induced by paclitaxel through and indirect  
mechanism  
Proc.Natl. Acad. Sci.USA 94: 9679-9683 (1997)
52. Lee J.M.; Bruckner H.W.; Szrajer ; Brenne U.; Schindelheim G.;  
Andreotti P.E.  
Taxol inhibits growth of mesothelioma xenografts  
Anticancer Research 15(3): 693-696 (1995)
53. Lin L.; Islam M.M. L.; Du M.; Ohmura Y.; Hiwasa T.; Fujimura S.  
Comparative analysis of HPLC profile of cytosolic thymidine kinase activity  
between hepatoma and regenerating liver in rat with reference to  
phosphorylation  
Intern.J. Oncol. 15 (2): 293-299 (1999)

54. Liteplo R.G.; Alvarez E.; Frost P.; Kerbel R.S.  
Induction of thymidine kinase activity in a spontaneously enzyme-deficient murine tumor cell line by exposure in vivo to the DNA-hypomethylating agent  
Cancer Res. 45(11): 5294-8 544 (1985)
55. Look K.Y.; Moore D.H.; Sutton G. P.; Prajda N.; Abonyi M.; Weber G.  
Increased thymidine kinase and thymidylate synthase activities in human epithelial ovarian cancers  
Anticancer Res. 17(4A): 2353-2356 (1997).
56. Markwell M.A.  
A modification of Lowry's procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples  
Anal.-biochem. 87(1): 206-210 (1978)
57. Marsh J.C. and Perry S.  
Thymidine catabolism by normal and leukemic human leucocytes  
J.Clin.Invest. 43: 267-278 (1964)
58. Marumo K.; Oya M.; Murai M.  
Biochemical modulation of 5-fluoro-uracil with murine interferon-alpha/beta against murine renal cell carcinoma  
Int.J.Urol. 4(2):163-168 (1997)

59. McKelvey V.J.; McKenna P.G.  
Enhanced synergism between caffeine and mitomycin C in the induction of  
cytogenetic aberrations in thymidine kinase-deficient Friend murine  
erythroleukemia cells  
Mutagenesis 1(3): 173-8 (1986)
60. McKennas P.G.; Yasseen A.A.; Mc Kelvey V.J.  
Evidence for indirect involvement of thymidine kinase in excision repair  
processes in mouse cell lines  
Somat.Cell-Mol.Genet. 11(3):239-46 (1985)
61. Mellado W.; Magri N.F.; Kingston D.G.I.; et al.  
Preparation and biological activity of taxol acetates  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 124:329-335 (1984)
62. Moghaddam A.; Zhang H.T.; Fan T.P.; Hu D.; Lees V.; Turley H.; Fox S.;  
Gatter K.; Harris A.; Bicknell R.  
Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth  
Proc.Nat.Ac.Acad.Scienc. 92(4): 998-1002 (1995)
63. Munch-Petersen B.; Cloos L.; Jensen H.K.; Tyrsted G.  
Human thymidine kinase 1. Regulation in normal and malignant cells  
Adv. Enzyme Reg.35: 69-89 (1995)

64. Munch-Petersen B.; Tyrsted G.  
Thymidine kinase isoenzymes in human acute monocyte leukemia  
Mol.Cell.-Biochem. 66(2):185-191 (1985)
65. Munch-Petersen B.; Tyrsted G.  
Thymidine kinase isoenzymes in human acute and chronic leukemia  
Leuk.Res. 10(6) 637-642 (1986)
66. Munch-Petersen B.; Tyrsted G.; Cloos L.; Beck R.A.; Eger K.  
Different affinity of the two forms of cytosolic thymidine kinase towards  
pyrimidine analogs  
Biochim.Biophys. Acta 1250(2): 158-162 (1995)
67. Nicolaou K.C.; Dai W.M.; Guy R.K.  
Chemistry and biology of taxol  
Angew Chem, 33:15-44 Ed (1994)
68. Nielsen S.E.; Munch-Petersen B.; Mejer J.  
Increased ratio between deoxycytidine kinase and thymidine kinase in CLL  
lymphocytes compared to normal lymphocytes  
Leuk.Res. 19(7): 443- 2 (1995)
69. Persson L.; Gronowitz S.J.; Källander C.R.  
Thymidine kinase extracts of human brain tumors  
Acta Neurochirurgica 80, 123-127 (1986)

70. Ponder E.  
The cell membrane and its properties ,  
in The Cell(J. Brachet and A.E. Mirsky, eds.), Vol II; Academic Press Ins.,  
New York 1961
71. Pulkkinen J., Elooma L., Joensuu H., Martikainen P., Servomaa K.,  
Grenman R.  
Paclitaxel-induced apoptotic changes followed by time-lapse video microscopy  
in cell lines established from head and neck cancer  
J. Cancer Res.Clin .Oncol. 122:214-218 (1996)
72. Pusch O.; Soucek T.; Hengstschlager-Ottner E.; Bernaschek G.;  
Hengstschlager M.  
Cellular targets for activation by c-myc include the DNA-metabolism enzyme  
thymidine kinase  
DNA-Cell-Biol. 16(6):737-747 (1997)
73. Rainbow A.J.  
Thymidine kinase deficient human cells have increased UV sensitivity in their  
capacity to support herpes simplex virus but normal UV sensitivity for colony  
formation  
Mutat.Res. 218(3); 189-96 (1989)

74. Rehn S.; Gronowitz J.S.; Kallander C.; Sundstrom C.; Glimelius B.  
Deoxythymidine kinase in tumour cells and serum of patients with non-  
Hodgkins' lymphoma  
Br.J.Cancer 71(5):1099-105 (1995)
75. Robinson B.W.S.; Bowman R.V.; Manning L.S.; Musk A.W.;  
Van Hazel G.A.  
Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in malignant mesothelioma  
Eur. Resp. Rev. 3:11. 220-222 (1993)
76. Robinson B.W.S.; Manning L.S., Bowman R. V., Christmas T.I.; Musk, A.W.;  
Davis M.R., Bielefeldt-Ohmann H.; Upham J.; Garlepp M.J.  
The scientific basis for the immunotherapy of human malignant mesothelioma  
Eur.Resp.Rev. 3:11, 195-198 (1993)
77. Rode W.; Les A.  
Molecular mechanism of thymidylate-synthase-catalyzed reaction and  
interaction of the enzyme with 2-and/or 4-substituted analogues of dUMP and  
5-fluoro-dUMP  
Acta.Biochim. Pol 43(1): 133-142 (1996)



78. Romain S.; Christensen J.; Chinot O.; Balslev I.; Rose C.; Martin P.M.; Thorpe S.M.  
Prognostic value of cytosolic thymidine kinase activity as a marker of proliferation in breast cancer  
Int.J.Cancer 1(1):7-12 (1995)
79. Romain S.; Martin P.M.; Klijn J.G.; Van Putten W.L.; Look M.P.; Guirou O.; Foekens J.A.  
DNA-synthesis enzyme activity: a biological tool useful for predicting anti-metabolic drug sensitivity in breast cancer?  
Int.J.Cancer 74(2): 156-161 (1997)
80. Roth W.; Wagenknecht B.; Grimm C.; Dichgans J.; Weller M.  
Taxol-mediated augmentation of CD95 ligand- induced apoptosis of human malignant glioma cells: association with bcl2 phosphorylation but neither activation of p53 nor G2/M cell cycle arrest  
British J. of Cancer 77(3) 401-411 (1998)
81. Ruddy S.M.; Hickey I.  
Reversion in thymidine kinase deficient variants of mouse lymphoma P388  
Mutat.Res. 227(3):187-19280. (1989)
82. Rubini J.R.; Keller S.; Eisentraut A. and Concrit E.P.;  
In vitro Metabolism  
Symp.InternAtEnergy Agency 2:247-267 (1961)

83. Santiago C.; Collins M.; Johnson L.F.  
In vitro and in vivo analysis of the control of dihydrofolate reductase gene  
transcription in serum-stimulated mouse fibroblasts  
J.Cell Physiol. 118(1): 79-86 (1984)
84. Sawada N.; Ishikawa T.; Fukase Y.; Nishida M.; Yoshikubo T.;  
Ishitsuka H.  
Induction of thymidine phosphorylase activity and enhancement of capecitabine  
efficacy by taxol/taxotere in human cancer xenografts  
Clinical cancer research 4(4): 1013-1019 (1998)
85. Schiff P.B.; Fant J.; Horwitz S.B.  
Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol  
Nature 277:6 65-667 (1979)
86. Schmid S.M.; Garrett B.D.; Coffield R.T.; Harrison S.D.  
Combination interferon beta (IFNbeta)/taxol in vitro with cell lines of various  
histogenesis: Supraadditive effects  
Proc. Am..Assoc.Cancer Res. 33:2646 (1992)
87. Schoen R.C.; Cox S.H.; Wagner R.P.  
Thymidine kinase activity of cultured cells from individuals with inherited  
galaktokinase deficiency  
Am.J.Hum.Genet. 36(4): 815 (1984)

88. Schwartz E.L.; Baptiste N.; Wadler S.; Makower D.  
Thymidine phosphorylase mediates the sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil  
J. Biol.Chem. 270(32):19073-7 (1995)
89. Stark G.R.  
Interferons: Biosynthesis, physiological roles, mechanism of induction and response.  
Interferons: Mechanism of action and role in cancer therapy  
Von D.Crowther Springer: 15-23; Berlin 1991
90. Van der Wilt Cl; Smid K.; Aherne G.W. Noordhuis P., Peters G.J.  
Biochemical mechanisms of interferon modulation of 5-fluorouracil activity in colon cancer cells  
European Journal of Cancer 33(3): 471.478 (1997)
91. Velazquez L.; Fellous M.; Stark G.R.; et al  
A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signalling pathway  
Cell 70:313-322 (1992)
92. Vertongen F.; Fondu P.; van-den-Heule B.; Cauchie C.; Mandelbaum I.M.  
Thymidine kinase and thymidine phosphorylase activities in various types of leukemia and lymphoma  
Tumour Biol. 5(6):303-311 (1984)

93. Vogelzang N.J.; Hernodon J.; Clamon G.H.; Mauer A.M.; Cooper M.R.;  
Green M.R.  
Paclitaxel(Taxol) for malignant mesothelioma(MM): A Phase II study of cancer  
and leukemia group B(CALGB 9234)(Meeting Abstract)  
Proc Ann.Meet.Am.Soc.Clin.Onc. 13:A1382 (1994)
94. Wakazono Y.; Kubota M., Sano H., Matsubara K.; Hirota H.; Kuwakado K.;  
Adachi S.  
Different effect of thymidine kinase loss on TTP pools; comparison among  
human leukemia cell lines  
Mutat.Res. 304. 295-3008 (1994)
95. Wakazono Y.; Kubota M.; Furusho K; Liu-L.; Gerson-S.L.  
Thymidine kinase deficient cells with decreased TTP pools are hypersensitive to  
DNA alkylating agents  
Mutat-Res- 362(1): 119-25 (1996)
96. Weber G.; Nagai M.; Natsumeda Y., Ichikawa S.; Nakamura H.; Eble J.N.;  
Jayaram H.N.;Zhen W.N.; Paulik E.; Hoffmann R.;  
Regulation of de novo and salvage pathways in chemotherapy  
Adv. Enzyme Regul. 31:45-67 (1991)
97. Weissmann C.; Weber H.  
The interferon genes  
Progr. Nucl. Acid Res. 33:251-302 (1986)

98. Wilmans W.  
Thymidinkinase in Leukämiezellen: Bedeutung für Charakterisierung und  
Verlaufsbeobachtung bei akuten Leukämien  
Abstract, 1. Bonner Symposium über die Thymidinkinase 1988
99. Zeng L.; Buard A.; Monnet I.; Boutin C.; Fleury J. ; Saint-Etienne L.;  
Brochard P.; Bignon J.; Jaursan; Jourand M.C.  
In vitro effects of recombinant human interferon gamma on human  
mesothelioma cell lines  
Int. J. Cancer 55(3):515-520 (1993)
100. Zopf G.; Berghäuser K.H.; v. Lieven H.  
Entzündungsartige Reaktionen an Tumoren und ihren Metastasen unter Beta-  
Interferon-Therapie  
Aktuelle Immunologie(12):-29-31 (1998)
101. Zopf G.; Kovacs G.; Rominger M.; v. Lieven H.  
Synergistischer cytotoxischer Effekt von Beta-Interferon und Taxol beim  
Pleuramesotheliom in vitro  
J.Cancer Res. Clin. Oncol. 121(Suppl P2..02.02) (1996)
102. Zopf G.; Rominger M.; Kovacs G., v Lieven.H.  
Effect of interferon –beta on proliferation and radiosensitivity of pleural  
msothelioma (Abstract)  
Proceedings of the tenth international congress of radiation research (1995)

## 7. Anhang(Tabellen)

Tab. 8 zu S.9, Kap3.1

Toxizität von Interferon und Taxol auf oxische und anoxische ZK 70 Mesotheliomzellen

### oxisch

Kontrolle	Anzahl der Kolonien	
	251	Mittelwert
	255	249,83
	238	
	245	Standardabw.
	241	10,4
	269	
	269	

6ng Taxol	Anzahl der Kolonien	
	122	Mittelwert
	116	120,33
	123	
	131	Standardabw.
	112	6
	118	

12 ng Taxol	Anzahl der Kolonien	
	83	Mittelwert
	79	84,3
	85	
	89	Standardabw.
	91	4,57
	79	

25 I. E. Int.	Anzahl der Kolonien	
	91	Mittelwert
	75	85
	81	
	85	Standardabw.
	87	5,65
	91	

6ng Tax+25I.E.	Anzahl der Kolonien	
	11	Mittelwert
	9	10,5
	5	
	12	Standardabw.
	16	3,3
	10	

12 ng +25I.E.Int	Anzahl der Kolonien	
	3	Mittelwert
	7	6,83
	9	
	6	Standardabw.
	8	2,26
	10	

### anoxisch

Kontrolle	Anzahl der Kolonien	
	261	Mittelwert
	279	268,5
	281	
	263	Standardabw.
	258	8,78
	269	
	269	

6 ng Taxol	Anzahl der Kolonien	
	132	Mittelwert
	144	135,5
	123	
	122	Standardabw.
	138	10,3
	152	

12ng Taxol	Anzahl der Kolonien	
	98	Mittelwert
	93	94
	101	
	87	Standardabw.
	94	4,54
	101	

25 I. E. Int.	Anzahl der Kolonien	
	103	Mittelwert
	110	105,5
	112	
	98	Standardabw.
	109	5,12
	101	

6ng Tax+25I.E.	Anzahl der Kolonien	
	15	Mittelwert
	10	11,5
	11	
	8	Standardabw.
	16	2,98
	9	

12 ngTaxol+25I.E	Anzahl der Kolonien	
	5	Mittelwert
	3	7,16
	7	
	8	Standardabw.
	10	2,26
	8	

## Proteinbezogener Tritium-Thymidin-Einbau

bei : ZK 70 Mesotheliomzellen

Kontrolle		
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein
30920	149,1	207,38
31660	205,3	154,21
34210	196,9	173,74
31110	229,5	135,56
35340	230,9	153,05
42460	194,9	217,86
46120	219,8	209,83
36550	247,6	147,62
34660	176,8	196,04
37410	201,1	186,03
37440	198,3	188,80
44180	184,5	239,46

Mittelwert	Standardabweichung
184,13	30,59

184,13      30,58870

12ng Taxol		
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein
14990	100,6	149,01
10600	108,9	97,34
12490	70,74	176,56
14610	88,07	165,89
15320	108,2	141,59
10780	94,31	114,30

Mittelwert :	Standardabweichung
140,78	27,59

140,78      27,59078

100IE β-Int.		
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein
16660	127,6	130,56
12700	76,28	166,49
28860	149,1	193,56
6600	94,31	69,98
28170	137,3	205,17
26750	131,1	204,04

Mittelwert	Standardabweichung
161,64	21,30

161,64      161,63556

12ng+100IE		
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein
13210	88,77	148,81
13210	110,3	119,76
11150	129	86,43
10050	108,2	92,88
10690	113,7	94,02
15030	129,7	115,88
9360	113	82,83
13310	142,9	93,14
13370	133,1	100,45
16040	115,1	139,36
7700	73,9	104,19
13810	101,2	136,46

Mittelwert :	Standardabweichung:
109,52	21,30

109,52      21,3043502



Tab. 10 zu Kap. 3.8 auf S. 35

Zeitverlauf des proteinbezogenen Tritiumthymidineinbaus bei ZK 684 Mesotheliomzellen

Proteinbezogener Tritium-Thymidineinbau Tag 1.

Kontrolle				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
3100	144,5	21,45	Mittelwert :	Standardabweichung
3120	149	20,94		
2960	144,5	20,48		
3120	137,7	22,66		
3220	136,9	23,52		
3910	133,1	29,38		
			23,07	3,00

12 ng Taxol		
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt./µg Protein
3950	131,6	30,02
3710	143	25,94
5330	158,1	33,71
3490	151,3	23,07
2980	134,7	22,12
3355	147,5	22,75

Mittelwert	Standardabweichung
	4,27

100 IE β Int.				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
2390	144,5	16,54	Mittelwert :	Standardabweichung
2140	136,2	15,71		
1890	124,1	15,23		
2430	132,4	18,35		
3010	124,8	24,12		
3160	123,3	25,63		
			19,26	4,11

12ng /100 IE				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
3890	100,6	38,67	Mittelwert :	Standardabweichung
3920	100,6	38,97		
3730	126,3	29,53		
6310	310	20,35		
3900	166,4	23,44		
4400	144,5	30,45		
			30,26	6,97

Tab. 11 zu Kap. 3.8 auf S. 35

Zeitverlauf des proteinbezogenen Tritiumthymidineinbaus bei Zk 684 Mesotheliomzellen

Proteinbezogener Tritium-Thymidineinbau Tag2

Kontrolle				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt./µg Protein		
5300	335,7	15,79	Mittelwert :	Standardabweichung
9720	352,3	27,59	30,61	9,22
9220	233,7	39,45		
10230	243,5	42,01		
8630	244,3	35,33		
2630	112	23,48		

12 ng Taxol				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt./µg Protein		
6170	331,2	18,63	Mittelwert	Standardabweichung
7100	233,7	30,38	25,58	4,38
8480	287,3	29,52		
6970	286,6	24,32		
7290	336,5	21,66		
8910	307,7	28,96		

100 IE β Int.				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
5930	279	21,25	Mittelwert :	Standardabweichung
8850	217	40,78	36,66	9,37
7480	217,8	34,34		
9120	284,3	32,08		
6190	118,8	52,10		
5120	130	39,38		

12ng /100 IE				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
4750	183,2	25,93	Mittelwert :	Standardabweichung
4510	172,4	26,16	20,22	4,82
3820	231,4	16,51		
3780	208	18,17		
4600	353,1	13,03		
4790	222,3	21,55		

Kontrolle				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
7590	218,6	34,72	Mittelwert :	Standardabweichung
7880	139,6	56,45	37,82	8,92
7500	195,1	38,44		
6400	230,6	27,75		
6400	186	34,41		
6090	173,2	35,16		

12 ng Taxol				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt./µg Protein		
6800	115	59,13	Mittelwert	Standardabweichung
6380	135,4	47,12	53,11	9,97
6380	124,1	51,41		
5150	108,2	47,60		
5930	143	41,47		
7620	105,9	71,95		

100 IE β Int.				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
5050	120,3	41,98	Mittelwert	Standardabweichung
3970	115	34,52	39,68	2,80
4410	109	40,46		
3830	96,1	39,85		
3720	97,61	38,11		
4570	105,9	43,15		

12ng /100 IE				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
6440	135,4	47,56	Mittelwert	Standardabweichung
6340	114,2	55,52	46,94	4,31
6160	149	41,34		
5380	118	45,59		
5830	130,1	44,81		
5700	121,8	46,80		

Tab. 13 zu Kap. 3.9 auf S. 36-37

**Zeitverlauf des proteinbezogenen Tritiumthymidinmonophosphateinbaus**

**Proteinbezogener Tritiumthymidinmonophosphateinbau am Tag 1**

Kontrolle				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
11600	88,54	131,01	Mittelwert :	Standardabweichung
26000	65,11	399,32	266,58	150,24
27290	56,04	486,97		
24020	74,94	320,52		
10930	71,16	153,60		
8680	82,5	105,21		

12 ng Taxol				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt./µg Protein		
20270	85,2	237,91	Mittelwert	Standardabweichung
9430	125,6	75,08	189,05	128
24440	71,6	341,34		
10790	151,3	71,32		
18650	64,3	290,05		
4010	74,94	53,51		

100 IE β Int.				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
8480	90,81	93,38	Mittelwert :	Standardabweichung:
103310	164,1	629,56	197,37	124,04
15430	66,62	231,61		
16660	43,19	385,74		
12490	133,9	93,28		
10320	130,9	78,84		

12ng /100 IE				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
17010	99,88	170,30	Mittelwert	Standardabweichung
17240	105,2	163,88	169,98	22,54
18320	101,4	180,67		
17570	121,8	144,25		
17080	111,2	153,60		
19660	97,61	201,41		

Tab. 14 zu Kap. 3.9 auf S. 36-37

**Zeitverlauf des proteinbezogenen Tritiumthymidinmonophosphateinbaus**

**Proteinbezogener Tritiumthymidinmonophosphateinbau am Tag 2**

Kontrolle				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt./µg Protein		
28130	112	251,16	Mittelwert	Standardabweichung
20210	126,8	159,38	181,08	31,85
25750	160,4	160,54		
24890	141,5	175,90		
25230	149	169,33		
24200	142,2	170,18		

12 ng Taxol				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt./µg Protein		
23890	246,5	96,92	Mittelwert	Standardabweichung
23210	152	152,70	121,02	34,00
21780	152	143,29		
21490	154,3	139,27		
24730	179,2	138,00		
9820	175,5	55,95		

100 IE β Int.				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
9700	116,5	83,26	Mittelwert :	Standardabweichung
10200	104,4	97,70	83,74	15,52
9560	107,4	89,01		
11990	133,1	90,08		
11280	122,6	92,01		
7280	144,5	50,38		

12ng /100 IE				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt./µg Protein		
6420	105,2	61,03	Mittelwert	Standardabweichung
6610	131,6	50,23	62,36	6,56
6600	96,1	68,68		
6320	84,01	75,23		
6640	101,4	65,48		
6230	93,83	66,40		

## Zeitverlauf des proteinbezogenen Tritiumthymidinmonophosphateinbaus

### Proteinbezogener Tritiumthymidinmonophosphateinbau am Tag 3

Kontrolle				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
36690	65,1	563,59	Mittelwert	Standardabweichung
35430	61,2	578,92	598,26	65,93
33440	60,7	550,91		
43670	59,5	733,95		
26440	48,9	540,70		
33500	53,9	621,52		

12 ng Taxol				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt./µg Protein		
30850	57,6	535,59	Mittelwert	Standardabweichung
26500	66,7	397,30	531,77	65,92
29330	49,6	591,33		
27520	52,4	525,19		
33160	60,9	544,50		
32880	55,1	596,73		

100 IE β Int.				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
12780	45,2	282,74	Mittelwert :	Standardabweichung
12550	42,7	293,91	280,99	13,96
10580	39,6	267,17		
11930	39,6	301,26		
11140	40,9	272,37		
10980	40,9	268,46		

12ng /100 IE				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
9320	52,6	177,19	Mittelwert	Standardabweichung
9930	55,7	178,28	177,58	4,39
9710	52,7	184,25		
7460	44	169,55		
9110	51	178,63		
8130	46,4	175,22		

Tab. 16 zu Kap. 3.10 auf S. 35

## Proteinbezogener Tritium-Thymidin-Einbau

bei : Sp 3 Ovarialkarzinomzelle

Kontrolle		
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein
26380	37,45	704,41
33570	22,89	1466,58
35050	28,43	1232,85
32510	22,19	1465,07
26150	28,43	919,80
42270	26,35	1604,17
29600	23,87	1240,05
42430	23,46	1808,61
47060	15,26	3083,88
43890	22,77	1927,54
37520	15,95	2352,35
47270	22,08	2140,85

Mittelwert	Standardabweichung
1662,18	627,83

12ng Taxol		
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein
35130	17,62	1993,76
26510	14,85	1785,19
31320	17,34	1806,23
38120	20,11	1895,57
35720	19,71	1812,28
28400	15,26	1861,07

Mittelwert	Standardabweichung
1859,02	70,61

100IE β-Int.		
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein
35130	34,67	1013,27
26060	34,67	751,66
23280	22,89	1017,04
30590	38,84	787,59
33500	35,7	938,38
29620	36,06	821,41

Mittelwert	Standardabweichung
888,22	106,45

12ng+100IE		
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein
16030	63,11	254,00
24740	73,51	336,55
23950	81,83	292,68
14020	33,98	412,60
21300	58,95	361,32
18830	65,19	288,85
23560	33,98	693,35
23220	40,92	567,45
23860	31,21	764,50
20570	43	478,37
24870	32,59	763,12
30130	36,06	835,55

Mittelwert	Standardabweichung
504,03	203,24

Tab. 17 zu Kap. 3.11 auf S. 39

**Proteinbezogener Tritiumthymidinmonophosphateinbau bei sp3-Ovarialcarcinomzellen**

Kontrolle				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
68510	25,66	2669,91	Mittelwert	Standardabweichung
64900	30,51	2127,17	1911,45	511,31
80540	40,92	1968,23		
79490	40,22	1976,38		
101710	35,37	2875,60		
58110	45,08	1289,04		
97400	41,61	2340,78		
72190	38,84	1858,65		
78340	48,54	1613,93		
75730	47,16	1605,81		
63100	41,61	1516,46		
76720	70,04	1095,37		

12ng Taxol				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
60030	46,46	1292,08	Mittelwert	Standardabweichung
83320	43,69	1907,07	2211,19	691,88
69390	27,74	2501,44		
88900	27,05	3286,51		
65780	42,3	1555,08		
77470	28,43	2724,94		

100IE β-Int.				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
65240	37,45	1742,06	Mittelwert	Standardabweichung
67800	36,06	1880,20	1209,35	453,90
53500	79,75	670,85		
99880	83,91	1190,32		
78590	92,93	845,69		
82290	88,77	927,00		

12ng+100IE				
Aktivität (pCi)	Protein (µg)	pCi Akt. / µg Protein		
21180	67,96	311,65	Mittelwert	Standardabweichung
13110	63,8	205,49	326,71	141,75
22240	74,2	299,73		
20660	65,19	316,92		
18990	63,11	300,90		
54990	73,51	748,06		
13010	65,19	199,57		
16320	68,66	237,69		
29670	72,12	411,40		
21530	76,28	282,25		
29790	77,67	383,55		
16570	74,2	223,32		



## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas und seine umfassende Unterstützung bei der Bearbeitung danke ich Herrn Prof. Dr. v. Lieven, Leiter der Abteilung Strahlentherapie der Wilhelm-Conrad-Röntgen-Klinik des medizinischen Zentrums für Radiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Außerdem bedanke ich mich

beim Laborteam: dem Leiter Herrn Dr. Kovacs und den Zivildienstleistenden Jörg Müller und Christian Vohla für die gute Zusammenarbeit.

bei Herrn Dr. Seibold(Strahlenzentrum) und Frau Stöpper für deren Unterstützung beim Ansetzen der Autoradiografien und deren Auswertung.

bei Herrn Dr. Berghäuser aus dem Pathologischen Institut für die Überlassung der Mesotheliomlinien und die Beratung bei der Etablierung weiterer Zelllinien.

## **Lebenslauf**

Name: Gisela Caroline Zopf

Geburtsdatum: 09.09. 1963

Geburtsort: Weinheim/Bergstraße

Eltern: Richard Zopf, Jurist

Pauline Zopf geb. Schmidt

Schule: 1970-1974 Grundschule, Weinheim

1974-1983 Gymnasium, Weinheim

1983 Abitur

Studium: Wintersemester 83/84- November 1989 Medizinstudium,

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

1985 Ärztliche Vorprüfung

1986 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1988 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1989 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Bisherige Berufstätigkeit: April 1990 bis Oktober 1991 als Ärztin im Praktikum

am Kreiskrankenhaus Calw, Innere Abteilung, Chefarzt Dr. Prokein

Oktober 1991 Erhalt der Approbation

Dezember 1991 –August 1998 Weiterbildung zur Ärztin

für Strahlentherapie an der Wilhelm-Conrad-Röntgen-Klinik

der Justus-Liebig-Universität Gießen, Leiter Prof. Dr. v. Lieven,

abgeschlossen mit der Facharztprüfung im August 1998

anschließend Tätigkeit als Fachärztin an der

Wilhelm-Conrad-Röntgen-Klinik, wissenschaftliche Tätigkeit im

Strahlenbiologischen Labor zur Erlangung der Promotion, dort derzeit

laufendes Forschungsprojekt zur Bedeutung der

Thymidylatsynthetaseinhibitoren und der Cytokine in der Tumorthherapie